(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2008/066199

発行日　平成22年3月11日(2010.3.11)

(43)国際公開日　平成20年6月5日(2008.6.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/07	(2010.01)	C12N	5/00	ZNAE	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
A61L 27/00	(2006.01)	A61L	27/00	Z	4C081

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 46 頁）

出願番号　特願2008-547073 (P2008-547073)
(21)国際出願番号　PCT/JP2007/073352
(22)国際出願日　平成19年12月3日(2007.12.3)
(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(71)出願人　504147243
国立大学法人　岡山大学
岡山県岡山市北区津島中一丁目１番１号
(74)代理人　100065226
弁理士　朝日奈　宗太
(74)代理人　100098464
弁理士　河村　洌
(74)代理人　100149630
弁理士　藤森　洋介
(74)代理人　100154449
弁理士　谷　征史
(72)発明者　小林　直哉
岡山県岡山市中区海吉２０３３－１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】胚性幹細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導方法、該方法により誘導されるインスリン分泌細胞およびその用途

(57)【要約】
本発明は、アクチビンを用いて未分化なＥＳ細胞から分化させた胚体内胚葉を、馴化培地を用いてニューロジェニン３発現細胞へ分化させたのちに該細胞を高グルコース培地で刺激することにより、インスリン分泌細胞へ効率的に分化誘導する方法に関する。
また、胚性幹細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導方法に加え、該方法により誘導されたインスリン分泌細胞、該細胞を含有する糖尿病治療薬、バイオ人工膵臓、研究試薬および創薬モデル動物に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
胚性幹細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導方法であって、
（ａ）線維芽細胞増殖因子およびアクチビンの存在下に胚性幹細胞を培養することにより胚体内胚葉へ分化させる工程、
（ｂ）得られた胚体内胚葉を、線維芽細胞増殖因子の存在下、馴化培地を用いて培養することにより原始膵へ分化させる工程、
（ｃ）得られた原始膵を、馴化培地を用いて培養することによりニューロジェニン３発現細胞数を増加させ、ニューロジェニン３発現細胞を得る工程、および
（ｄ）得られたニューロジェニン３発現細胞を、高グルコース濃度の細胞培養用培地中で刺激してインスリン分泌細胞へ分化させる工程
を含む方法。
【請求項２】
線維芽細胞増殖因子が線維芽細胞増殖因子－１０以外の線維芽細胞増殖因子である請求の範囲第１項記載の方法。
【請求項３】
アクチビンがアクチビンＡである請求の範囲第１項または第２項記載の方法。
【請求項４】
アクチビンの濃度が２～２００ｎｇ／ｍＬである請求の範囲第１項～第３項のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
工程（ｂ）において用いられる馴化培地が、ヒト神経膠芽細胞腫由来細胞株Ｔ９８Ｇを細胞培養培地中で培養したものである請求の範囲第１項～第４項のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
工程（ｃ）において用いられる馴化培地が、ヒト不死化肝類洞内皮細胞株ＴＭＮＴ－１細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６（郵便番号３０５－８５６６）、寄託日：平成１４年４月１６日、受託番号：ＦＥＲＭ　ＢＰ－８０１７）または血管内皮細胞を低グルコース細胞培養培地中で培養したものである請求の範囲第１項～第５項のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
各工程における培養がそれぞれ、コラーゲンタイプＩＶ、マトリゲル、フィブロネクチン、ジェラチン、ポリオルニチンおよびラミニンよりなる群から選ばれる生体適合性材料を用いる三次元培養である請求の範囲第１項～第６項のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
工程（ａ）において用いられる生体適合性材料がコラーゲンタイプＩＶである請求の範囲第７項記載の方法。
【請求項９】
工程（ｃ）において用いられる生体適合性材料がラミニンである請求の範囲第７項または第８項記載の方法。
【請求項１０】
工程（ａ）における細胞培養濃度が1×10^{5}～4×10^{5}細胞／ｍＬである請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
工程（ｂ）における細胞培養濃度が1×10^{5}～8×10^{5}細胞／ｍＬである請求の範囲第１項～第１０項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
工程（ａ）および／または（ｂ）における線維芽細胞増殖因子の濃度が２～２０ｎｇ／ｍＬである請求の範囲第１項～第１１項のいずれかに記載の方法。

【請求項１３】
工程（ａ）において用いられる培地が、細胞培養用培地中に、ウシ胎仔血清を０．２～３％含有し、ウシ血清アルブミンを２～３％含有する請求の範囲第１項～第１２項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
工程（ｂ）において用いられる培地が、馴化培地中にレチノイン酸を１～５０μｍｏｌ／Ｌ含有する請求の範囲第１項～第１３項のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
工程（ｃ）において用いられる培地が、馴化培地中にγ－セクレターゼ阻害剤ＸＶＩＩＩを０．２５～２μｍｏｌ／Ｌ含有し、線維芽細胞増殖因子を５～５０ｎｇ／ｍＬ含有し、上皮増殖因子を５～５０ｎｇ／ｍＬ含有する請求の範囲第１項～第１４項のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
工程（ｃ）において、ニューロジェニン３発現細胞がセルソーターを用いて選別される請求の範囲第１項～第１５項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
工程（ｄ）において用いられる培地が、肝細胞増殖因子を２～５０ｎｇ／ｍＬ含有し、ニコチンアミドを１～１０ｍｍｏｌ／Ｌ含有し、エクセディン－４を５～１００ｎｍｏｌ／Ｌ含有し、トログリタゾン１～１０μｍｏｌ／Ｌおよび硫酸亜鉛を１～２０μｍｏｌ／Ｌ含有する請求の範囲第１項～第１６項のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
工程（ｄ）が、ニューロジェニン３発現細胞を高グルコース濃度の細胞培養用培地、次いで低グルコース濃度の細胞培養用培地中で繰り返し刺激培養する工程からなり、高グルコース濃度の細胞培養用培地中で１回あたり２時間の刺激培養を、１日あたり１～３回行うことを１～１０日間繰り返す請求の範囲第１項～第１７項のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
工程（ｄ）において用いられる培地が、高グルコース濃度の細胞培養培地中に脂質、アミノ酸、ビタミンおよび／またはミネラルを含有する請求の範囲第１項～第１８項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
工程（ｄ）が、さらにニューロジェニン３発現細胞にＭａｆＡ遺伝子を導入し発現させることにより、インスリン分泌細胞のＭａｆＡ遺伝子発現を増強させることを含む請求の範囲第１項～第１９項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
胚性幹細胞が哺乳類由来のものである請求の範囲第１項～第２０項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
哺乳類がマウス、ヒト、サルよりなる群から選ばれる請求の範囲第２１項記載の方法。
【請求項２３】
哺乳類がマウスである請求の範囲第２２項記載の方法。
【請求項２４】
請求の範囲第１項～第２３項のいずれかに記載の方法により誘導されるインスリン分泌細胞。
【請求項２５】
インスリン分泌細胞が、スフェロイドを形成しているインスリン分泌細胞を含有する請求の範囲第２４項記載のインスリン分泌細胞。
【請求項２６】
請求の範囲第２４項または第２５項記載のインスリン分泌細胞を含有する糖尿病治療剤。
【請求項２７】

請求の範囲第２４項または第２５項記載のインスリン分泌細胞を含有するバイオ人工膵臓。

【請求項２８】

請求の範囲第２４項または第２５項記載のインスリン分泌細胞を含有する研究試薬。

【請求項２９】

請求の範囲第２４項または第２５項記載のインスリン分泌細胞を含有する創薬モデル動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、胚性幹細胞（以下、ＥＳ細胞とも言う）のインスリン分泌細胞への分化誘導方法および該方法により誘導されるインスリン分泌細胞、ならびに糖尿病治療薬、バイオ人工膵臓、研究試薬および創薬モデル動物に関する。

【背景技術】

【０００２】

２０００年カナダ・エドモントンのアルバータ大学から臨床膵島移植７症例についての報告がなされた（シャピロ（Shapiro AM）ら、N. Engl. J. Med., (2000)343, p.230-238.参照）。後に‘エドモントン・プロトコール’と呼ばれる免疫抑制剤の斬新な使用法によって膵島移植を受けた全ての１型糖尿病症例でインスリン療法から離脱できたと言うものである。膵島移植はインスリン依存型糖尿病患者にとって現在もっとも理想に近い治療法である。膵臓は外分泌腺と内分泌腺から構成されている。膵臓全容積の９８％以上を外分泌腺が占め、内分泌腺は２％以下である。１８６９年ランゲルハンスによって見いだされた内分泌腺組織は、光学顕微鏡像において外分泌腺組織の海の中に浮かぶように存在する島のように見えることから膵島（islet）と呼ばれる。膵島は内分泌細胞の集団であり、α細胞、β細胞、ＰＰ細胞、δ細胞などからなっている。体内のホルモンで唯一血糖を下げる作用をもつインスリンは膵島のβ細胞から分泌される。この膵島を膵臓から単離し、インスリン依存型糖尿病の患者に移植して一旦廃絶した血糖降下システムの置換再生を目指すのが膵島移植である。β細胞は膵島を構成する全細胞の８０～８５％を占めている。β細胞は単にインスリンを分泌するのみではない．さらに重要なのは、血中の糖分を感知することができると言うことである。糖代謝におけるインスリン分泌調節の主体は複数の器官が関与した複雑な系に依存していない。すなわち膵島単独で運動時や摂食時などの急激に変化する血糖に対して迅速に反応し、それにみあった適量のインスリンを分泌することによって血糖を非常に狭い範囲に調節することが可能である。効果対象の感知と作用の調節が一種類の細胞単独でおこなわれ、その細胞が膵島の大部分を占めていると言う事実が膵島移植の理論的根拠となっている。

【０００３】

膵島単離成功の是非は、単離に用いる膵臓自体の善し悪しにかかっている。良好な膵島単離のためには外分泌腺組織の状態も良い必要がある。膵島単離を目的とした膵臓摘出には想像以上の繊細さが要求される。例えば、膵臓にさわって圧力をかけるだけでも、膵外分泌細胞はその含有酵素である蛋白分解酵素が放出されるため自己融解がはじまる。また、遠隔地で膵臓が摘出された場合、膵島単離施設までの輸送中の保存についても充分な配慮が必要となる。

【０００４】

インスリンの不足あるいは欠乏がその原因となっている糖尿病が膵島移植の適応となる。活性の低下の原因に基づいて糖尿病は大きく二つに分類される。一つは何らかの原因によって膵β細胞が破壊、障害されてインスリンの分泌がなくなるもの、もう一つは血中にインスリンが正常あるいは正常以上に存在するのだがインスリン抵抗性が末梢組織に存在するためインスリンの作用が低下しているものである。前者が１型糖尿病あるいは若年型糖尿病、後者が２型糖尿病と呼ばれる。膵島移植の適応は１型糖尿病である。２型糖尿病においても病期が進むと糖毒性やβ細胞の疲弊によってインスリンの不足を来すが、２型

糖尿病は現在のところ膵島移植の適応とはなっていない。理由は、インスリンの分泌がある程度保たれている２型糖尿病に対してインスリンがほとんど分泌されていない１型糖尿病ではインスリン療法による血糖調節が非常に困難であること、２型糖尿病はその病態の基盤にインスリン抵抗性をもつため膵島移植の効果が懸念されるためである。２型糖尿病でも血糖の厳格な調節は予後に良好に働くが、移植膵島の不足と言う厳然たる事実があり１型糖尿病のみが膵島移植の対象となっている。将来移植膵島の供給が豊富となるような状況下では、インスリン抵抗性を契機としたインスリン非依存型糖尿病もその適応となる可能性は充分にある。

【０００５】

統計によると欧米では年間人口比（１０万人中）１２人から３５人（日本では１．５人）が１型糖尿病を発症している。欧米社会において糖尿病は解決すべき大きな社会問題である。糖尿病の一次予防と、合併症の二次予防のための対策が急務であると言える。

【０００６】

１９９３年に糖尿病コントロールと合併症に関する臨床試験（Diabetes Control and Complications Trial、ＤＣＣＴ）によるインスリン強化療法の合併症に対する効果が発表されている（The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N. Engl. J. Med., (1993)329, p.977-986.参照）。これは、可能な限り厳格なインスリン療法であるインスリン強化療法によって長期合併症の予防が可能かどうかとの疑問に対する臨床試験である。インスリン強化療法は従来のインスリン療法に比べて長期合併症の発症あるいは進行を３９％から７６％減少させ、同時に低血糖発症率を３倍に増やしたと言う結果であった。この臨床試験によって、糖尿病の長期合併症を回避するためには血糖の厳格な調節が非常に有用であり、インスリン強化療法によってある程度その目標は達成可能であることが示された。だが、このことは同時にインスリン療法では完璧な血糖調節は不可能であり、長期合併症予防にも限界があることを意味した。１型糖尿病は自己免疫の異常によって、インスリンを産生する膵β細胞が特異的に破壊されることで発症する（アトキンソン（Atkinson MA）ら、N. Engl. J. Med., (1994)331, p.1428-1436.参照）。その根本的治療には、膵β細胞の再生置換療法のひとつである移植が考えられる。この方法として膵臓移植と膵島移植がある。これら二つの移植の目的は、非常に厳格な血糖調節を可能とし、低血糖さらには長期合併症の発症を回避することである。単にインスリン療法による日常の煩わしさから患者を開放し生活の質（ＱＯＬ）を向上させる事だけが目的ではない。移植療法はインスリン依存性糖尿病を治癒と言う最終目標に向かわせる手段として、インスリン療法よりは遙かに潜在能力を持った治療法である。しかしながら、現行の膵島移植には大きな問題点がある。移植膵島の不足である。現在の膵島単離技術がいかに向上しようがこれを解決することは不可能である。需要と供給のバランスが違いすぎる。膵島移植が一般的移植医療とはなり得てもそのためのウエイティング・リストは膨大なものとなり、１型糖尿病患者が実際に膵島移植の恩恵を得るには数年から十数年を要すると言う事態になる。すなわち１型糖尿病患者が日常臨床で提示される治療法の選択肢として膵島移植が挙げられることはありえない。

【０００７】

すでに臨床膵島移植で実証された膵島細胞の有効性と移植膵島の絶対的不足と言う２つの現実を前にして、膵島あるいは膵β細胞に匹敵する機能をもつ細胞を作製することは高い社会的貢献と大きな医療経済的影響を有するものである。また、近年急速に進歩し注目を集めている幹細胞研究でも膵内分泌細胞への分化誘導の可能性が示されており（ルメルスキー（Lumelsky N）ら、Science, (2001), May18;292(5520), p.1389-1394.およびアッサディ（Assady S）ら、Diabetes, (2001), 50, p.1691-1697.参照）、人為的膵β細胞産生に対する関心をさらに助長する要因となっている。

【０００８】

糖尿病の患者数は１型および２型糖尿病ともに増加しており、糖尿病に伴う失明、腎不全および心血管系病変などの重篤な合併症が多発していることからも、急増するであろう当該医療費に対する対策は、高齢化社会をむかえるにあたって、医療上および社会的な緊

急課題である。現在臨床で用いられているインスリン投与療法では、たとえ厳格な監視下でも１型糖尿病の血糖コントロール、２型糖尿病の合併症の発症防止は極めて困難である。血糖を感知してそれに対する過不足ない量のインスリンを分泌する細胞を移入することで１型糖尿病を完治できると言う考えが今や世界中で一般的となった。しかしながら、膵臓移植および膵島単離に要する脳死体からの摘出膵はそれを必要とする患者数に対して圧倒的に少なく、今後解消される見込みはない。

【０００９】

そこで、ブタ組織や細胞を利用した研究が進む一方、人畜共通感染症、生体組織適合性や倫理的問題も浮上してきた。とくにウイルスの潜在的危険性が大きな問題となってきた。ブタの臓器や細胞が保有するブタ由来のウイルス（とりわけ、内因性ブタ特異的レトロウイルス（porcine endogenous retrovirus；ＰＥＲＶ）は、染色体に組み込まれているために排除は不可能である）がレシピエントに感染して病気を起こす危険性、それが家族や医療スタッフに感染を広げ、さらに社会に新しいウイルス感染を広げる可能性である（ペイシャンス（Patience C）ら、Nat. Med., (1997), 3(3), p.282-286.参照）。

【００１０】

よって、ヒト成熟膵島β細胞にかわる細胞の供給源として、胚性幹細胞（ＥＳ細胞とも言う）や組織幹細胞からのインスリン分泌細胞の分化誘導は魅力的である。よって、これまで多くの研究者によって、当該研究に関する報告がなされている（ルメルスキーら、Science, (2001), May18;292(5520), p.1389-1394.、ホリ（Hori Y）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2002) Dec10;99(25), p.16105-16110.、ラジャゴパル（Rajagopal J）ら、Science, (2003) Jan17;299(5605), p.363.、シピオネ（Sipione S）ら、Diabetologia, (2004) 47(3), p.499-508.、ミヤザキ（Miyazaki S）ら、Diabetes. (2004) 53(4), p.1030-1037.、ハンソン（Hansson M）ら, Diabetes, (2004) 53(10), p.2603-2609.およびダムール（D’Amour K A）ら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.参照）。

【００１１】

しかしながら、ルメルスキーら、Science, (2001), May18;292(5520), p.1389-1394.、ホリら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2002) Dec10;99(25), p.16105-16110.、ラジャゴパルら、Science, (2003) Jan17;299(5605), p.363.、シピオネら、Diabetologia, (2004) 47(3), p.499-508.、ミヤザキら、Diabetes. (2004) 53(4), p.1030-1037.およびハンソンら、Diabetes, (2004) 53(10), p.2603-2609.に記載された手法はインスリン分泌細胞への分化誘導効率が低く（３％以下である）、かつ分泌されるインスリン量も正常膵島と比較するとｍｇ蛋白あたり１，０００分の一と少ない。これは、いずれの手法も未分化なＥＳ細胞からインスリン分泌細胞を誘導するための初期分化のために、胚様体形成を最初の工程で行っているためである。胚様体形成を行うことで、分化が誘導されるが、細胞が外胚葉、内胚葉、中胚葉と全ての方向への分化してしまうため、目的とするインスリン分泌細胞は、内胚葉に属するために、他の外胚葉や中胚葉へと分化してくる細胞を淘汰することができないため、最終的な分化誘導率が低く成ってしまうと言う欠点を有する。

【００１２】

一方で、未分化なＥＳ細胞を胚様体を形成させることなく胚体内胚葉を形成させ、インスリン分泌細胞へ分化誘導させる手法が報告されている（「ダムール法」と言うこともある）（ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.参照）。胚様体形成を行わないこの手法は、胚様体形成を行う手法と比較して効率よくインスリン分泌細胞を得ることが可能である。しかしながら、ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.に記載された従来技術によるインスリン分泌細胞への分化誘導効率は３～１２％とかなり低い効率である。また、該従来技術により得られたインスリン分泌細胞のインスリン分泌量が正常膵島の１００分の１から５００分の１と低い効率である。これは、ダムール法では処置過程において、膵臓の発生過程でβ細胞への分化を抑制（ミラレス（Miralles F）ら、Int J Dev Biol. 2006; 50(1):17-26.参照）し、膵外分泌細胞を誘導する（ブシュシャン（Bhusha

ｎＡ）ら、Development. 2001;128(24):5109-17参照）と報告されている線維芽細胞増殖因子－１０（ＦＧＦ－１０）を使用していることが要因のひとつである。

【発明の開示】

【００１３】

本発明の目的は、充分に機能的であり、大量供給が可能で安全なインスリン分泌細胞ならびに該細胞を用いた糖尿病治療薬、バイオ人工膵臓、研究試薬および創薬モデル動物を提供することである。

【００１４】

前記問題点に鑑み鋭意検討した結果、アクチビンを用いて未分化なＥＳ細胞から分化させた胚体内胚葉を、馴化培地を用いてニューロジェニン３発現細胞へ分化させたのちに該ニューロジェニン３発現細胞を高グルコース培地で刺激することにより、インスリン分泌細胞へ効率的に分化誘導できることを見出し、本発明を完成した。

【００１５】

すなわち、本発明は、胚性幹細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導方法であって、（ａ）線維芽細胞増殖因子およびアクチビンの存在下に胚性幹細胞を培養することにより胚体内胚葉へ分化させる工程、（ｂ）得られた胚体内胚葉を、線維芽細胞増殖因子の存在下、馴化培地を用いて培養することにより原始膵へ分化させる工程、（ｃ）得られた原始膵を、馴化培地を用いて培養することによりニューロジェニン３（Ｎｇｎ３）発現細胞数を増加させ、ニューロジェニン３発現細胞を得る工程、および（ｄ）得られたニューロジェニン３発現細胞を、高グルコース濃度の細胞培養用培地中で刺激してインスリン分泌細胞へ分化させる工程を含む方法に関する。

【００１６】

線維芽細胞増殖因子は線維芽細胞増殖因子－１０以外の線維芽細胞増殖因子であることが好ましい。

【００１７】

アクチビンはアクチビンＡであることが好ましい。

【００１８】

アクチビンの濃度が２～２００ｎｇ／ｍＬであることが好ましい。

【００１９】

工程（ｂ）において用いられる馴化培地が、ヒト神経膠芽細胞腫由来細胞株Ｔ９８Ｇを無血清細胞培養培地中で培養したものであることが好ましい。

【００２０】

工程（ｃ）において用いられる馴化培地が、ヒト肝内皮細胞株ＴＭＮＫ－１または血管内皮細胞を低グルコース細胞培養培地中で培養したものであることが好ましい。

【００２１】

各工程における培養がそれぞれ、コラーゲンタイプＩＶ、マトリゲル、フィブロネクチン、ジェラチン、ポリオルニチンおよびラミニンよりなる群から選ばれる生体適合性材料を用いる三次元培養であることが好ましい。

【００２２】

工程（ａ）において用いられる生体適合性材料がコラーゲンタイプＩＶであることが好ましく、工程（ｃ）において用いられる生体適合性材料がラミニンであることが好ましい。

【００２３】

工程（ａ）における細胞培養濃度が１×１０^{5}～４×１０^{5}細胞／ｍＬであることが好ましく、工程（ｂ）における細胞培養濃度が１×１０^{5}～８×１０^{5}細胞／ｍＬであることが好ましい。

【００２４】

工程（ａ）および／または（ｂ）において、線維芽細胞増殖因子の濃度が２～２０ｎｇ／ｍＬであることが好ましい。

【００２５】

工程（ａ）において用いられる培地が、無血清細胞培養用培地中に、ウシ胎仔血清を０．２～３％含有し、ウシ血清アルブミンを２～３％含有することが好ましい。

【００２６】

工程（ｂ）において用いられる培地が、馴化培地中にレチノイン酸を１～５０μｍｏｌ／Ｌ含有することが好ましい。

【００２７】

工程（ｃ）において用いられる培地が、馴化培地中にγ－セクレターゼ阻害剤ＸＶＩＩＩを０．２５～２μｍｏｌ／Ｌ含有し、線維芽細胞増殖因子を５～５０ｎｇ／ｍＬ含有し、上皮増殖因子を５～５０ｎｇ／ｍＬ含有することが好ましい。

【００２８】

工程（ｃ）において、ニューロジェニン３発現細胞が、セルソーターを用いて選別されることが好ましい。

【００２９】

工程（ｄ）において用いられる培地が、肝細胞増殖因子を２～５０ｎｇ／ｍＬ含有し、ニコチンアミドを１～１０ｍｍｏｌ／Ｌ含有し、エクセディン－４を５～１００ｎｍｏｌ／Ｌ含有し、トログリタゾン１～１０μｍｏｌ／Ｌおよび硫酸亜鉛を１～２０μｍｏｌ／Ｌ含有することが好ましい。

【００３０】

工程（ｄ）が、ニューロジェニン３発現細胞を高グルコース濃度の細胞培養用培地、次いで低グルコース濃度の細胞培養用培地中で繰り返し刺激培養する工程からなり、高グルコース濃度の細胞培養用培地中で１回あたり２時間の刺激培養を、１日あたり１～３回行うことを１～１０日間繰り返すことが好ましい。

【００３１】

工程（ｄ）において用いられる培地が、高グルコース濃度の細胞培養培地中に脂質、アミノ酸、ビタミンおよび／またはミネラルを含有することが好ましい。

【００３２】

工程（ｄ）が、ニューロジェニン３発現細胞にＭａｆＡ遺伝子を導入し発現させることにより、インスリン分泌細胞のＭａｆＡ遺伝子発現を増強させることを含むことが好ましい。

【００３３】

胚性幹細胞が哺乳類由来のものであることが好ましく、哺乳類がマウス、ヒト、サルよりなる群から選ばれることがさらに好ましく、哺乳類がマウスであることが最も好ましい。

【００３４】

本発明はまた、前記分化誘導方法により誘導されるインスリン分泌細胞に関する。

【００３５】

インスリン分泌細胞が、スフェロイドを形成しているインスリン分泌細胞を含有することが好ましい。

【００３６】

本発明はさらに、前記インスリン分泌細胞を含有する糖尿病治療剤に関する。

【００３７】

本発明はさらに、前記インスリン分泌細胞を含有するバイオ人工膵臓に関する。

【００３８】

本発明はさらに、前記インスリン分泌細胞を含有する研究試薬に関する。

【００３９】

本発明はさらに、前記インスリン分泌細胞を含有する創薬モデル動物に関する。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１】本発明の方法によりマウスＥＳ細胞から分化誘導されたマウス胚体内胚葉における胚体内胚葉特異的遺伝子Ｆｏｘａ２およびＳｏｘ１７の遺伝子発現をＲＴ－ＰＣＲ法に

て判定した写真である。レーン１～４は、それぞれコラーゲンタイプＩＶ、マトリゲル、ラミニンタイプ１、ジェラチンで培養したマウス胚体内胚葉の遺伝子発現を示す。

【図２】本発明の方法によりコラーゲンタイプＩＶで加工した培養皿を用いてマウスＥＳ細胞から分化誘導されたマウス胚体内胚葉における胚体内胚葉特異的遺伝子Ｆｏｘａ２およびＳｏｘ１７の遺伝子発現をＲＴ－ＰＣＲ法にて判定した写真である。レーン１～４は、それぞれアクチビンＡの濃度が２ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌ、１００ｎｇ／ｍｌ、２００ｎｇ／ｍｌで添加し培養したマウス胚体内胚葉の遺伝子発現を示す。

【図３】本発明の方法によりマウス胚体内胚葉から分化誘導されたマウス原始膵における原始膵特異的遺伝子Ｐｄｘ－１の遺伝子発現、ネガティブコントロールであるＳｈｈ遺伝子発現、および内因性標準であるＧＡＰＤＨ遺伝子発現をＲＴ－ＰＣＲ法にて判定した写真である。レーン１～４は、それぞれレチノイン酸濃度が１μＭ、１０μＭ、１００μＭ、１０００μＭで添加し培養したマウス原始膵の遺伝子発現を示す。

【図４（ａ）】本発明の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞のＭａｆＡ遺伝子発現を示す顕微鏡像である。１は核を示し、２は球状を呈すインスリン分泌細胞全体を示す。

【図４（ｂ）】本発明の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞の形態を示す顕微鏡像である。１は核を示し、２は球状を示すインスリン分泌細胞を示す。

【図５（ａ）】本発明の分化誘導方法により工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭを用いてマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞および従来技術の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞のインスリン分泌能を示すグラフである。横軸の１～１０は、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで２日間培養後「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の１）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで２日間培養後「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の２）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで４日間培養後「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の３）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで４日間培養後「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の４）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで７日間培養後「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の５）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで７日間培養後「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の６）、従来技術であるシュローダー法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の７）、従来技術であるシュローダー法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の８）、従来技術であるダムール法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の９）、従来技術であるダムール法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の１０）をそれぞれ示す。

【図５（ｂ）】本発明の分化誘導方法により工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地を用いてマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞および従来技術の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞のインスリン分泌能を示すグラフである。横軸の１～１０は、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地で２日間培養後「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の１）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地で２日間培養後「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の２）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地で４日間培養後「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の３）、本発明のインスリン分泌細

胞を工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地で４日間培養後「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の４）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地で７日間培養後「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の５）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地で７日間培養後「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の６）、従来技術であるシュローダー法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の７）、従来技術であるシュローダー法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の８）、従来技術であるダムール法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の９）、従来技術であるダムール法のインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（横軸の１０）をそれぞれ示す。

【図６（ａ）】本発明の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞および従来技術の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞のトルブタミド刺激前のインスリン分泌能を示すグラフである。横軸の１～５は、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで２日間培養（横軸の１）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで４日間培養（横軸の２）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで７日間培養（横軸の３）、従来技術であるシュローダー法によるインスリン分泌細胞（横軸の４）、および従来技術であるダムール法によるインスリン分泌細胞（横軸の５）を示す。

【図６（ｂ）】本発明の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞および従来技術の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞のトルブタミド刺激後のインスリン分泌能を示すグラフである。横軸の１～５は、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで２日間培養（横軸の１）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで４日間培養（横軸の２）、本発明のインスリン分泌細胞を工程（ｄ）において低グルコースＤＭＥＭで７日間培養（横軸の３）、従来技術であるシュローダー法によるインスリン分泌細胞（横軸の４）、および従来技術であるダムール法によるインスリン分泌細胞（横軸の５）を示す。

【図７】本発明の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞、未分化マウスＥＳ細胞、またはマウス膵島を糖尿病マウスへ移植し、移植後の血糖値を測定したグラフである。コントロールとして、健常マウスおよび移植を行っていない糖尿病マウスを用いている。移植後の最初の５日間は健常マウスおよび移植を行っていない糖尿病マウス共に中間型ヒトインスリンＮＰＨを２単位（ＩＵ）皮下注射し、その後の５日間は中間型ヒトインスリンＮＰＨを１単位皮下注射している。

【図８】本発明のバイオ人工膵臓の一実施態様を示す図である。バイオ人工膵臓は球状を呈しているインスリン分泌細胞７を注入する細胞注入口３、蓋４、免疫担当細胞の透過を阻止するためのポリエチレン－ビニルアルコール膜（ポアサイズは３０ｎｍ）５、細胞接着のためのＰＡＵ加工したＰＴＦＥ不織布６からなる。

【図９】本発明の分化誘導方法によりマウスＥＳ細胞から誘導されたインスリン分泌細胞、未分化マウスＥＳ細胞、またはマウス膵島を充填した本発明のバイオ人工膵臓を糖尿病マウスへ埋め込み、埋め込み後の血糖値を測定したグラフである。コントロールとして、健常マウスおよび移植を行っていない糖尿病マウスを用いている。移植後の最初の１０日間は健常マウスおよび移植を行っていない糖尿病マウス共に中間型ヒトインスリンＮＰＨを２単位（ＩＵ）皮下注射している。

【発明を実施するための最良の形態】

【００４１】

本発明は、アクチビンを用いて未分化なＥＳ細胞から分化させた胚体内胚葉を、馴化培

地を用いてニューロジェニン３発現細胞へ分化させたのちに該細胞を高グルコース培地で刺激することにより、インスリン分泌細胞へ効率的に分化誘導する方法に関する。

【００４２】

本発明のＥＳ細胞からインスリン分泌細胞を分化誘導する方法には、（ａ）線維芽細胞増殖因子およびアクチビンの存在下に胚性幹細胞を培養することにより胚体内胚葉へ分化させる工程、（ｂ）得られた胚体内胚葉を、線維芽細胞増殖因子の存在下、馴化培地を用いて培養することにより原始膵へ分化させる工程、（ｃ）得られた原始膵を、馴化培地を用いて培養することによりニューロジェニン３発現細胞数を増加させ、ニューロジェニン３発現細胞を得る工程、および（ｄ）得られたニューロジェニン３発現細胞を、高グルコース濃度の細胞培養用培地中で刺激してインスリン分泌細胞へ分化させる工程を含む方法が含まれる。

【００４３】

ＥＳ細胞としては、哺乳類由来のものが好ましく、哺乳類としては、マウス、ヒト、サルなどが挙げられる。また、ＥＳ細胞に代えてＥＳ細胞のように分化多能性を有する誘導多能性幹細胞（または人工多能性幹細胞ともいう）（induced pluripotent stem cell、ｉＰＳ細胞）も、本発明において同様に使用することができる。ｉＰＳ細胞は脊髄損傷、若年型糖尿病など多くの疾患に対する細胞移植療法につながることが期待されており、患者自身の体細胞からｉＰＳ細胞を誘導した場合、移植後の免疫拒絶反応も克服できる（ホームページhttp://www.jst.go.jp/pr/info/info320/index.html）。

【００４４】

ＥＳ細胞は、受精卵が成長を続ける初期の段階である胚から製造することができる。卵子と精子が１つになった受精卵は、胎児へと成長していく途中で２つ、４つ、８つ・・・と分裂を繰り返し、５、６日目には胚盤胞と呼ばれる状態になる。胚盤胞は直径０．１ｍｍほどの球状のかたまりである内部細胞塊を抱く胞胚腔から構成される。内側の細胞塊は、いずれ内胚葉、中胚葉、外胚葉へと成長し、体のあらゆる細胞を形作っていく部分で、栄養外胚葉はそれらの胎盤を形成し、また胚を外界から隔離する袋を形成する。この内部細胞塊をほぐしたのち、細胞を取り出し、これらの細胞を増殖可能でかつ分化しない環境で培養することによりＥＳ細胞を製造することができる。したがって、ＥＳ細胞は、前記のとおり胚から製造することができる。

【００４５】

このようなＥＳ細胞は、マウスでは１９８１年にエバンスら（Evans et al., 1981, Nature 292: 154-6.）や、マーチンら（Martin GR. et al., 1981, Proc Natl Acad Sci 78: 7634-8.）によって樹立され、商品としては大日本住友製薬株式会社（大阪、日本）などから購入可能である。

【００４６】

このようなＥＳ細胞は、ヒトでは１９９８年にトムソンら（Thomson et al.,Science,1998,282:1145-7.）によって樹立され、ＷｉＣｅｌｌ研究施設（WiCell Research Institute、ウェブサイト:http://www.wicell.org/、マジソン、ウイスコンシン州、米国）から入手可能である。

【００４７】

我国においては、ヒトＥＳ細胞の研究はナショナルバイオリソースプロジェクトに指定されており、京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターで樹立されたヒトＥＳ細胞が、「再生医科学研究所ヒトＥＳ細胞分配規定」（平成１５年１１月２６日施行）にしたがって、文部科学大臣の確認（承認）を得るなどの一定の条件下に入手が可能であるため、万人が実験を自由に行うことはできない状況がある。しかしながら、ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.においてダムールらがヒトＥＳ細胞からインスリン分泌細胞が誘導できることを、また、成体の膵島から分離されたネスチン陽性の幹細胞をアクチビンＡとＨＧＦないしはアクチビンＡとベータセルリンないしは、ニコチン酸アミドとエクセンディン－４の存在下で培養することでラットおよびヒトで同程度に種を問わずインスリン分泌細胞へ誘導できることを報

告している事実を鑑みると、いずれの種由来のＥＳ細胞、特にヒト由来のＥＳ細胞を使用しても、本発明にしたがってインスリン分泌細胞へ分化誘導することができることは当業者に明らかである（Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. Diabetes 2001;50(3):521-33参照）。

【００４８】

ｉＰＳ細胞は、体細胞に特定の因子を導入することにより作製することができる。マウス体細胞に４つの因子（Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4）をレトロウイルスベクターで導入することにより、形態や増殖能がES細胞と類似し、分化多能性も有するｉＰＳ細胞を作製することができる（Takahashi K, Yamanaka S., Cell. 25;126(4):663-76, 2006.）。ヒト成人皮膚に由来する体細胞に、マウスと同じ４因子をレトロウイルスベクターで導入し、その後、ヒトES細胞の条件で培養することでヒトｉＰＳ細胞も作製することができる（Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S., Cell. 2007 131(5):861-72.）。

【００４９】

このように、ｉＰＳ細胞は、受精卵を使用する必要がなく、倫理面の問題が少ないため、好ましく用いることができる。またこれらの細胞は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に大きく寄与する可能性が高い。

【００５０】

本発明の細胞の培養方法において用いられる培地は、細胞を増殖させることができるものであればいかなる組成のものでもよく、無機質、糖、アミノ酸、ペプチド、ビタミン、有機酸、核酸、ｐＨ調整剤、酵素等の細胞の培養に必要な成分を含有するものであればよい。

【００５１】

本発明において、ＥＳ細胞の分化誘導培養に用いる容器としては、分化誘導能、機能発現能、および生存能等の点から生体適合性材料を用いたスキャフォールドでコートされた培養皿を使用するのが好ましい。該スキャフォールドとしては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン（コラーゲンタイプＩＶやコラーゲンタイプＩなど）、ジェラチン、エンタクチン、ポリオルニチン、自己組織化能を有するペプチドハイドロゲル、Ｐｏｌｙ（ｐ－Ｎ－ｖｉｎｙｌｂｅｎｚｙｌ－Ｄ－ｌａｃｔｏｎａｍｉｄｅ）（ＰＶＬＡ）（ラクトースを側鎖にもつポリスチレン誘導体）などが挙げられる。市販品としてはマトリゲル（Ｍａｔｒｉｇｅｌ、ラミニン５６％、コラーゲンタイプＩＶ３１％、エンタクチン８％からなる、ベクトン ディッキンソン アンド カンパニー製）、グロースファクターリデュースドマトリゲル（ＧＦＲ Ｍａｔｒｉｇｅｌ、ラミニン６１％、コラーゲンＩＶ３０％、エンタクチン７％からなる、ベクトン ディッキンソン アンド カンパニー製）、ピュラマトリックス（ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ、アミノ酸１６残基（Ａｃ－（ＲＡＤＡ）$_4$－ＣＯＮＨ$_2$）で長さが約５ｎｍのオリゴペプチドであるペプチドハイドロゲル、株式会社スリー・ディー・マトリックス・ジャパン製）、Ｐｏｌｙ（ｐ－Ｎ－ｖｉｎｙｌｂｅｎｚｙｌ－Ｄ－ｌａｃｔｏｎａｍｉｄｅ）（ＰＶＬＡ）（有限会社セラジックス製）などが挙げられる。ＥＳ細胞から胚体内胚葉への分化誘導培養する工程（工程（ａ））においては、コラーゲンタイプＩＶもしくはマトリゲルで加工した培養皿が最も好ましく、次いでフィブロネクチン、ジェラチン、ラミニン、非加工の順で好ましい。胚体内胚葉を原始膵へ分化させる工程（工程（ｂ））においては、コラーゲンタイプＩＶもしくはマトリゲルで加工した培養皿が最も好ましく、次いでフィブロネクチン、ジェラチン、ラミニン、非加工の順が好ましい。原始膵からニューロジェニン３発現細胞を得る工程（工程（ｃ））においては、ラミニンで加工した培養皿が最も好ましく、次いでマトリゲル、フィブロネクチン、コラーゲンタイプＩＶ、ジェラチン、非加工の順が好ましい。ニューロジェニン３発現細胞からインスリン分泌細胞へ分化させる工程（工程（ｄ））においては、マトリゲル加工培養皿が最も好ましく、ポリオルニチン（ｐｏｌｙｏｒｎｉｔｉｎｅ）、フィブ

ロネクチン、ラミニン、コラーゲンタイプＩＶ、ジェラチン、非加工の順が好ましい。

【００５２】

本発明のＥＳ細胞から胚体内胚葉への分化誘導培養する工程（工程（ａ））において用いられる培地としては、たとえば、（１）ホルモン成長因子を添加した無血清細胞培養用培地、（２）ＥＳ分化誘導培地（ＤＭＥＭ　Ｆ１２）〔ＤＭＥＭ（インビトロジェン社製）と栄養素混合物ハムＦ－１２（インビトロジェン社製）が１：１容量比の割合で混合され、４．５ｍｇ／ｍＬ濃度のグルコース、２０％ＦＢＳ、２ｍｍｏｌ／Ｌ－グルタミン、２５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＨＥＰＥＳ（インビトロジェン社製）、１００ｍｇ／ｍＬペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬストレプトマイシン（シグマ－アルドリッチ　コーポレーション製）を加え、ＬＩＦを加えないもの〕、（３）霊長類ＥＳ細胞用培地（（株）リプロセル製など）、（４）マウス胚性線維芽細胞用馴化培地（Ｒ＆Ｄシステム製など）などが挙げられる。なかでもホルモン成長因子を添加した無血清細胞培養用培地が好ましく、無血清細胞培養用培地としては、ＲＰＭＩ１６４０培地（シグマ社製）、ＤＭＥＭ培地（インビトロジェン社製）、ハムＦ－１２培地（インビトロジェン社製）などが挙げられ、ＲＰＭＩ１６４０培地、ＤＭＥＭ培地およびハムＦ－１２培地の混合成分から構成される混合培地が好ましい。ホルモン成長因子としては、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミンなどが挙げられ、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウムおよびエタノールアミンを全て添加することが好ましい。市販されている好ましい培地としては、エス・クロン（Ｓ－Ｃｌｏｎｅ）培地（三光純薬株式会社製）が挙げられ、造血幹細胞研究用無血清基本培地エス・クロンＳＦ－０３培地（三光純薬株式会社製）を用いることが好ましい。培養時の細胞濃度は1×10^{5}～4×10^{5}細胞／ｍＬであることが好ましく、1.75×10^{5}細胞／ｍＬであることが最も好ましい。培養温度は２２～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．４の範囲が好ましい。工程（ａ）の培養期間は１～７日程度である。

【００５３】

前記工程（ａ）に用いる培地には、分化誘導因子、細胞増殖因子などを加えることが好ましい。たとえば、アクチビンおよび／または線維芽細胞成長因子を加えることが好ましく、アクチビンおよび線維芽細胞成長因子の両方を加えることがとくに好ましい。アクチビンとしては、アクチビンＡ、アクチビンＢ、アクチビンＡＢ等が挙げられ、好ましいものとしてアクチビンＡが挙げられる、次いでアクチビンＡＢ、アクチビンＢである。培地に加える濃度としては、アクチビンでは２～２００ｎｇ／ｍＬ、線維芽細胞成長因子では５～２０ｎｇ／ｍＬであることが好ましく、アクチビンでは５～１５０ｎｇ／ｍＬ、線維芽細胞成長因子では１０～２０ｎｇ／ｍＬであることがさらに好ましく、アクチビンでは１０～１００ｎｇ／ｍＬ、線維芽細胞成長因子では２０ｎｇ／ｍＬであることが最も好ましい。線維芽細胞増殖因子の濃度が前記範囲未満の場合、細胞が死滅する傾向があり、一方前記範囲を超える場合、中胚葉に分化する傾向がある。さらに前記培地には、ウシ胎仔血清、ヒト血清などの血清および血清アルブミンを添加することが好ましい。たとえば、０．２～３％のウシ胎仔血清および２～３％ウシ血清アルブミンを添加することが好ましく、０．２％のウシ胎仔血清および２．５％ウシ血清アルブミンを添加した培地で６～２４時間培養後、１％のウシ胎仔血清および２．５％ウシ血清アルブミンを添加した培地で６～４８時間培養し、次いで３％のウシ胎仔血清および２．５％ウシ血清アルブミンを添加した培地で１２～９６時間培養後することがより好ましく、０．２％のウシ胎仔血清および２．５％ウシ血清アルブミンを添加した培地で１２～２４時間培養後、１％のウシ胎仔血清および２．５％ウシ血清アルブミンを添加した培地で２４～４８時間培養し、次いで３％のウシ胎仔血清および２．５％ウシ血清アルブミンを添加した培地で４８～９６時間培養することが最も好ましい。

【００５４】

本発明の胚体内胚葉を原始膵へ分化させる工程（工程（ｂ））において用いる培地としては、たとえば、ヒト細胞株を無血清細胞培養用培地で培養した馴化培地（コンディショント　メディウム（ＣＭ）とも言う）が挙げられる。ヒト細胞株としては、ヒト神経膠芽

細胞腫由来細胞株Ｔ９８Ｇ（ＡＴＣＣ番号、ＣＲＬ－１６９０）、神経外胚葉性腫瘍細胞株（human neuroectodermal tumor cell line）ＳＫ－ＰＮ－ＤＷ（ＡＴＣＣ番号、ＣＲＬ－２１３９）などが挙げられ、ヒト神経芽種由来細胞株としては、たとえば、以下のものが利用可能である（いずれも、ＡＴＣＣ（米国）から入手可能である。ホームページは、www.atcc.org参照）。

【００５５】

ヒト神経芽細胞株（embryonal neuroblastoma）ＳＫ－Ｎ－ＤＺ、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２１４９

ヒト神経芽細胞株ＳＫ－Ｎ－ＡＳ、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２１３７

ヒト神経芽細胞株ＳＫ－Ｎ－ＦＩ、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２１４２

ヒト脳由来；線維芽細胞種ＩＭＲ－３２、ＡＴＣＣ番号：ＣＣＬ－１２７

ヒト神経芽細胞株ＣＨＰ－２１２、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２２７３

ヒト神経芽細胞株ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２２６６

ヒト神経芽細胞株ＢＥ（２）－Ｍ１７、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２２６７

ヒト神経芽細胞株ＢＥ（２）－Ｃ、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２２６８

ヒト神経芽細胞株ＳＫ－Ｎ－ＢＥ（２）、ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－２２７１

ヒト神経芽細胞株ＳＫ－Ｎ－ＳＨ、ＡＴＣＣ番号：ＨＴＢ－１１

【００５６】

また、以下の細胞株も利用可能である（Ｃｈｅｍｉｃｏｎから入手可能である。ホームページは、www.chemicon.com参照）。

不死化膵間葉細胞株ＬＴ２（ＬＴ２　Immortalized Pancreatic Mesenchymal Cell Line）、カタログ番号：ＳＣＲ０１３

原始膵間葉細胞株ＶＩＴ１（ＶＩＴ１　Primary Pancreatic Mesenchymal Cell Line）、カタログ番号：ＳＣＲ０１４

【００５７】

なかでも、ヒト神経膠芽細胞腫由来細胞株Ｔ９８Ｇ（ＡＴＣＣ番号、ＣＲＬ－１６９０）をエス・クロンＳＦ－０３培地で培養した馴化培地を用いることが最も好ましい。馴化培地作製時の細胞培養濃度は５×１０^{5}～１×１０^{6}細胞／ｍＬであることが好ましく、８×１０^{5}細胞／ｍＬであることが最も好ましい。馴化培地作製時の培養温度は３５～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．５の範囲が好ましい。培養期間は３～５日程度である。馴化培地を使用する前にはフィルターなどで細胞を除去することが好ましい。胚体内胚葉の培養の細胞濃度は１×１０^{5}～８×１０^{5}細胞／ｍＬであることが好ましく、１．７５×１０^{5}細胞／ｍＬであることが最も好ましい。培養温度は２２～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．５の範囲が好ましい。培養期間は４～１０日程度である。

【００５８】

前記工程（ｂ）に用いる培地には、たとえば、線維芽細胞成長因子および／またはレチノイン酸を加えることが好ましく、レチノイン酸および線維芽細胞成長因子の両方を加えることがとくに好ましい。培地に加える濃度としては、レチノイン酸では１～５０μｍｏｌ／Ｌ、線維芽細胞成長因子では５～２０ｎｇ／ｍＬであることが好ましく、レチノイン酸では１０～２０μｍｏｌ／Ｌ、線維芽細胞成長因子では１０～２０ｎｇ／ｍＬであることがさらに好ましく、レチノイン酸では１０μｍｏｌ／Ｌ、線維芽細胞成長因子では２０ｎｇ／ｍＬであることが最も好ましい。線維芽細胞増殖因子の濃度が前記範囲未満の場合、細胞が死滅する傾向があり、一方前記範囲を超える場合、中胚葉に分化する傾向がある。

【００５９】

本発明の原始膵からニューロジェニン３発現細胞を得る工程（工程（ｃ））において用いる培地としては、ヒト細胞株を低グルコース培地で培養した馴化培地が挙げられる。ヒト細胞株としては、ヒト肝内皮細胞株、ヒト血管内皮細胞株、が挙げられ、たとえば、以下の細胞株が利用可能である（ＳｃｉｅｎＣｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手可能である（http://www.sciencellonline.com/products/endothelia

l.htm参照））。

【００６０】

カタログ番号１０００　ＨＢＭＥＣ（ヒト脳血管内皮細胞（Human Brain Microvascular Endothelial Cells））

カタログ番号１３００　ＨＣＰＥＣ（ヒト脳脈絡叢血管内皮細胞（Human Choroid Plexus Endothelial Cells））

カタログ番号２９００　ＨＩＭＥＣ（ヒト小腸血管内皮細胞（Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells））

カタログ番号６０００　ＨＣＭＥＣ（ヒト心臓血管内皮細胞（Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells）

カタログ番号６１００　ＨＡＥＣ（ヒト大動脈血管内皮細胞（Human Aortic Endothelial Cells））

カタログ番号６５３０　ＨＲＥＣ（ヒト網膜血管内皮細胞（Human Retinal Endothelial Cells））

カタログ番号８０００　ＨＵＶＥＣ（ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells））

カタログ番号８０１０　ＨＵＡＥＣ（ヒト臍帯動脈血管内皮細胞（Human Umbilical Artery Endothelial Cells））

【００６１】

なかでもヒト肝内皮細胞株またはヒト血管内皮細胞株を用いることが好ましく、特にヒト不死化肝類洞内皮細胞株ＴＭＮＴ－１細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６（郵便番号３０５－８５６６）、寄託日：平成１４年４月１６日、受託番号：ＦＥＲＭ　ＢＰ－８０１７）を用いることが最も好ましい。このＴＭＮＴ－１細胞株は、シミアンウイルス４０腫瘍抗原（ＳＶ４０Ｔ）遺伝子発現レトロウイルスベクターＳＳＲ＃６９およびテロメラーゼ遺伝子（ｈＴＥＲＴ）発現レトロウイルスベクターＳＳＲ＃１９７を使用し、正常ヒト成人肝類洞内皮細胞を不死化して樹立した分化能を有する肝類洞内皮細胞株である。馴化培地作製時の細胞濃度は５×１０^{5}～１０×１０^{5}細胞／ｍＬであることが好ましく、８×１０^{5}細胞／ｍＬであることが最も好ましい。馴化培地作製時の培養温度は３５～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．５の範囲が好ましい。培養期間は３～５日程度である。馴化培地を使用する前にはフィルターなどで細胞を除去することが好ましい。

【００６２】

ニューロジェニン３（Ｎｇｎ３）プロモーター下にｅＹＦＰ（enhanced yellow fluorescence；増強黄色蛍光タンパク質）を一過性に発現するプラスミドベクターｎｇｎ３－Ｓｐｅｌ－ｅＹＦＰ（以下の論文から当該プラスミドベクターは入手可能である。Mellitzer G, Martin M, Sidhoum-Jenny M, Orvain C, Barths J, Seymour PA, Sander M, Gradwohl G. Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice. Mol Endocrinol. 18(11):2765-76. 2004）を導入する時の細胞濃度は１００×１０^{5}～５００×１０^{5}細胞／ｍＬであることが好ましく、１００×１０^{5}～２００×１０^{5}細胞／ｍＬであることが最も好ましい。遺伝子導入時の培養温度は３５～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．５の範囲が好ましい。導入期間は１～５秒程度である。遺伝子導入および選別後の培養における細胞濃度は１×１０^{4}～１×１０^{5}細胞／ｍＬであることが好ましく、３×１０^{4}～８×１０^{4}細胞／ｍＬであることがさらに好ましく、５×１０^{4}細胞／ｍＬであることが最も好ましい。培養温度は３５～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．５の範囲が好ましい。培養期間は３～１０日程度である。

【００６３】

前記工程（ｃ）に用いる馴化培地には、細胞増殖因子などを加えることが細胞の分化誘導効率を考慮すると好ましい。たとえば、上皮細胞増殖因子および／または線維芽細胞成

長因子を加えることが好ましく、上皮細胞増殖因子および線維芽細胞成長因子の両方を加えることがとくに好ましい。培地に加える濃度としては、上皮細胞増殖因子では５～５０ｎｇ／ｍＬ、線維芽細胞成長因子では５～５０ｎｇ／ｍＬであることが好ましく、上皮細胞増殖因子では１０～５０ｎｇ／ｍＬ、線維芽細胞成長因子では１０～５０ｎｇ／ｍＬであることがさらに好ましく、上皮細胞増殖因子では２０ｎｇ／ｍＬ、線維芽細胞成長因子では２０ｎｇ／ｍＬであることが最も好ましい。線維芽細胞増殖因子の濃度が前記範囲未満の場合、細胞の増殖が減弱する傾向がある。さらに前記馴化培地には、γ－セクレターゼインヒビターＸＶＩＩＩを０．２５～２μｍｏｌ／Ｌ添加することが好ましく、０．５～１．５μｍｏｌ／Ｌ添加することがより好ましく、１μｍｏｌ／Ｌ添加することが最も好ましい。γ－セクレターゼインヒビターＸＶＩＩＩを添加せずに培養を行うと、細胞の生存率が低下する傾向がある。

【００６４】

本発明のニューロジェニン３発現細胞からインスリン分泌細胞へ分化させる工程（工程（ｄ））において用いる培地としては、ヒト膵島を低グルコース培地で培養した馴化培地、ＲＰＭＩ１６４０培地、Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地、ＣＭＲＬ１０６６培地（インビトロジェン社製）、低グルコースＤＭＥＭ培地（インビトロジェン社製）、などが挙げられ、インスリン分泌細胞の疲弊を防ぐ点から、低グルコース培地を用いることが好ましい。インスリン分泌細胞のグルコース応答性を高める点から、低グルコース培地を用いた培養中、血清無添加の高グルコース培養培地に毎日１～３回、それぞれ約２時間（限定されないが、１時間～３時間が好ましく、１時間半から２時間半が更に好ましい。）刺激培養することがより好ましい。細胞培養濃度は1×10^5～10×10^5細胞／ｍＬであることが好ましく、5×10^5～7×10^5細胞／ｍＬであることが最も好ましい。培養温度は２２～３７℃の範囲が好ましく、ｐＨは７．２～７．５の範囲が好ましい。培養期間は１～１０日である事が好ましく、５～７日であることが最も好ましい。

【００６５】

前記工程（ｄ）に用いる培地には、肝細胞増殖因子、ニコチンアミド、硫酸亜鉛、トログリタゾン（troglitazone）、エクスディン－４（exendin-4）の１種または２種以上加えることが好ましく、全種類加えることがとくに好ましい。培地に加える濃度としては、肝細胞増殖因子では２～２０ｎｇ／ｍＬ、ニコチンアミドでは１～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛では１～２０μｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾンでは１～１０μｍｏｌ／Ｌ、エクスディン４では５～１００ｎｍｏｌ／Ｌであることが好ましく、肝細胞増殖因子では２～１０ｎｇ／ｍＬ、ニコチンアミドでは５～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛では１０～２０μｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾンでは５～１０μｍｏｌ／Ｌ、エクスディン－４では１０～１００ｎｍｏｌ／Ｌであることがさらに好ましく、肝細胞増殖因子では１０ｎｇ／ｍＬ、ニコチンアミドでは１０ｍｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛では１６．７μｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾンでは１０μｍｏｌ／Ｌ、エクスディン－４では１００ｎｍｏｌ／Ｌであることが最も好ましい。さらに低グルコース培地には、ウシ胎仔血清、ヒト血清などの血清を添加することが好ましく、３～５％のウシ胎仔血清を添加することが好ましい。３％のウシ胎仔血清を添加した培地で２～４日間培養後５％のウシ胎仔血清を添加した培地で３～５日間培養することがより好ましく、３％のウシ胎仔血清を添加した培地で３日間培養後５％のウシ胎仔血清を添加した培地で４日間培養することが最も好ましい。

【００６６】

工程（ｄ）において、細胞を刺激するときに用いる高グルコース培地には、高グルコースＤＭＥＭ培地などをそのまま用いることもできるが、高グルコースＤＭＥＭ培地などにさらに脂質、アミノ酸、ビタミンおよび／またはミネラルを添加して用いることが好ましく、高グルコースＤＭＥＭ培地に脂質、アミノ酸、ならびにビタミンおよびミネラルを添加して用いることが最も好ましい。

【００６７】

工程（ｄ）において、馴化培地作製に使用するヒト膵島は、健常分離ヒト膵島を不死化し増殖した後に不死化遺伝子を除去して得ることが好ましい。健常分離ヒト膵島は、公知

の方法に従ってヒト膵臓から分離することができる（Staudacher C, Ricordi C, Stella M, Socci C, Cammelli L, Ferrari G, Dicarlo V. Minerva Chir. 31: 1665-1668, 1985 または Ricordi C, Finke EH, Lacy PE., Diabetes 35: 649-653, 1986参照）。不死化ヒト膵島は、一対の部位特異的組換え配列に挟まれた不死化遺伝子をベクターにより膵島に導入することにより作製することができる。部位特異的組換え配列としては、ＬｏｘＰ配列やＦＲＴ配列などが挙げられ、不死化遺伝子としては、ＤＮＡ型腫瘍ウイルスの腫瘍抗原（Ｔ抗原）遺伝子であるＳＶ４０Ｔ遺伝子およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）遺伝子などがあげられる。不死化遺伝子導入ベクターとしては、ＳＶ４０Ｔ遺伝子を含有するｐＹＫ－１ベクターが挙げられ、当該ベクター、ベクター導入方法、ＳＶ４０Ｔ遺伝子の切り出し方法は当業者であれば、本発明者の一人である小林らの手法：国際公開第２００５／１００５４６号パンフレットおよび／またはMiki A, Narushima M, Okitsu T, Takeno Y, Soto-Gutierrez A, Rivas-Carrillo JD, Navarro-Alvarez N, Chen Y, Tanaka K, Noguchi H, Matsumoto S, Kohara M,Lakey JR, Kobayashi E, Tanaka N, Kobayashi N. Maintenance of mouse, rat, and pig pancreatic islet functions by coculture with human islet-derived fibroblasts. Cell Transplant. 2006;15(4):325-34.を参照し作製することができる。

【００６８】

高グルコース培地とは、ＲＰＭＩ１６４０培地、ＤＭＥＭ培地、ハムＦ－１２培地などの無血清細胞培養用培地中に含まれるグルコース濃度が３６００ｍｇ／Ｌ～４５００ｍｇ／Ｌである培地を示し、低グルコース培地とは、無血清細胞培養用培地中に含まれるグルコース濃度が６００ｍｇ／Ｌ～１０００ｍｇ／Ｌである培地を示す。好ましい高グルコース培地および低グルコース培地としては、それぞれ高グルコースＤＭＥＭ培地（インビトロジェン社製）ならびにヒト膵島を低グルコース培地で培養した馴化培地および低グルコースＤＭＥＭ培地（インビトロジェン社製）がそれぞれ挙げられる。

【００６９】

本発明の分化誘導工程それぞれで用いる線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）の好ましい例としては、ＦＧＦ－２、ＦＧＦ－５などが挙げられ、好ましくない例としては、ＦＧＦ－１０が挙げられる。

【００７０】

用語「インスリン分泌細胞」とは、インスリンを合成し、細胞外へ分泌する能力を有する細胞を意味する。

【００７１】

用語「胚体内胚葉」とは英語ではｄｅｆｉｎｉｔｉｖｅ　ｅｎｄｏｄｅｒｍと言い、マウスの３．５日胚は胚盤胞と呼ばれ、外側を包む栄養外胚葉と将来体をつくる内部細胞塊に区別される。内部細胞塊はまだ未分化な状態だが、原腸形成によって内胚葉、中胚葉および外胚葉へと最初の分化を遂げる。内胚葉の分化は少々複雑で、将来胚に取り込まれる胚体内胚葉（Definitive Endoderm）と、胚体外内胚葉をつくる臓側内胚葉（Visceral Endoderm）に分けられる。興味深いことに、胚体内胚葉の一部は、中内胚葉（Mesendoderm）と呼ばれる内胚葉と中胚葉の共通の前駆細胞に由来している（http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/pdf/051201_nishikawa_mesendoderm.pdf参照）。
を意味する。

【００７２】

用語「原始膵」とは英語ではｐｒｉｍｉｔｉｖｅ　ｐａｎｃｒｅａｓと言い、肝芽の少し尾方の腹側から生じる前腸から発生する腹側膵臓芽（ventral pancreatic bud）と、中腸の背側から発生する背側膵臓芽（dorsal pancreatic bud）を併せたもの（http://www.ams-jusei.jp/09/amsnews_pdf/2005-10-21.pdf参照）を意味する。

【００７３】

本発明において、分化誘導を行なう培養工程には、平面培養と三次元培養のいずれも使用できるが、近年、スキャフォールド（足場）上で細胞を三次元培養することでより生体内環境に近い条件を作ることができ、細胞機能が向上することが知られてきており、イン

スリン分泌能の向上などの点から三次元培養が好ましい。

【００７４】

三次元培養に使用するスキャフォールドとしては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンＩＶ、コラーゲンＩなどのコラーゲン、ジェラチン、エンタクチン、ペプチドハイドロゲル、ｐｏｌｙ（p-N-vinylbenzyl-D-lactonamide）（ＰＶＬＡ）などが挙げられる。市販品としては、前記マトリゲル（Matrigel）、グロースファクターリデューストマトリゲル（GFR Matrigel）、ピュラマトリックス（PuraMatrix）などが挙げられる。さらに、後述する不織布などが使用できる。

【００７５】

本発明の方法によりＥＳ細胞より分化誘導された胚体内胚葉、原始膵、ニューロジェニン３発現細胞およびインスリン分泌細胞は、形態学的特徴の観察および／または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）で確認できる。

【００７６】

形態学的な確認方法としては、透過電子顕微鏡検査、インスリン染色などが挙げられ、細胞に特異的な形態学的特徴を確認することが挙げられる。

【００７７】

また、ＲＴ－ＰＣＲにより、分化誘導された細胞の形質を遺伝子の発現から評価することもできる。分化誘導の進行を表わす指標として、工程（ａ）において胚体内胚葉のマーカーであるＦｏｘａ２（肝細胞核因子３β、hepatocyte nuclear factor 3, beta）、Ｓｏｘ１７（性決定領域Ｙ、Sex determining region Y）の遺伝子発現が認められる。工程（ｂ）において原始膵のマーカーであるＦｏｘａ２、Ｓｏｘ１７、Ｐｄｘ－１（膵転写因子、pancreatic transcription factor）の遺伝子発現が認められる。Ｓｈｈ（ソニックヘッジホッグ）の遺伝子発現が認められない。

【００７８】

本発明に係るＥＳ細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導方法によれば、アクチビンを用いて未分化なＥＳ細胞から分化させた胚体内胚葉を、馴化培地を用いてニューロジェニン３発現細胞へ分化させたのちに該ニューロジェニン３発現細胞を高グルコース培地で刺激することにより、高い分化誘導効率でインスリン分泌細胞を誘導でき、さらにはインスリンを効率よく分泌する細胞の製造が可能となる。本発明の分化誘導方法においては、分化誘導効率および得られる細胞のインスリン分泌能は、従来の手法である胚様体を形成する分化誘導方法と比較してそれぞれ３～５倍以上および３～５倍以上となることが好ましく、それぞれ約５～１０倍以上および約５～１０倍以上となることがさらに好ましい。

【００７９】

インスリン分泌能は、培地中に分泌された総タンパク質量（ｍｇ）に対するインスリン分泌量（ｎｇ）で算出することができ、グルコース刺激後に測定を行いインスリン分泌能を算出することによりインスリン分泌細胞の機能を評価することができる。

【００８０】

インスリン分泌細胞への分化誘導効率は、分化誘導方法における最終工程に用いるインスリンを分泌しない細胞数（本発明では、分化誘導方法の工程（ｃ）で得られ、工程（ｄ）に用いるニューロジェニン３発現細胞数が該当する）に対するインスリン分泌細胞数で評価することができる。

【００８１】

本発明の分化誘導方法によれば、４０～６０％の分化誘導効率でインスリン分泌細胞を得ることが可能である。この効率は、ダムールら、Nat. Biotech., published online,19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.に記載された分化誘導効率（３～１２％、平均７．３％）と比較するとかなり高い。また、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は、正常膵島の２０分の１から５０分の１のインスリン分泌能を有する。この分泌能は、該従来技術により得られたインスリン分泌細胞のインスリン分泌能（正常膵島の１００分の１から５００分の１）と比較するとかなり高い。

【００８２】

また、インスリン分泌細胞は、ＭａｆＡ遺伝子を発現することが好ましい。ＭａｆＡはインスリンプロモーター上に結合する膵臓のβ細胞におけるインスリンの分泌に必須である転写因子である。ＭａｆＡＫＯノックアウトマウスを作製した研究では、このマウスはランゲルハンス島の構築異常や、インスリン分泌異常を示すことから、ＭａｆＡは糖代謝に非常に重要な因子であることが明らかとなった（ホームページhttp://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/Maf.html参照）。本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は、ＭａｆＡ遺伝子を発現する能力を有する。これに対し従来技術であるダムール法で分化誘導されたインスリン分泌細胞はＭａｆＡ遺伝子を発現していないことが報告されている(ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.参照）。ＭａｆＡ遺伝子を発現する能力を有する細胞であることは、その細胞がグルコース応答性を有していること、インスリン分泌細胞として成熟していることの指標となる。

【００８３】

ＭａｆＡはインスリン分泌細胞がみずから発現していることが好ましいが、当該細胞の成熟度を高め、グルコース応答性を高めるために、ＭａｆＡ遺伝子を含有するベクターを工程（ｄ）において細胞に導入し発現させることで、ＭａｆＡ遺伝子発現を増強させることが好ましい態様として挙げられる。

【００８４】

また、本発明の分化誘導方法によれば、インスリン分泌細胞のスフェロイド形成（球形で、直径が１００～３００μｍである）が可能となる。

【００８５】

用語「スフェロイド」とは、三次元的球状細胞塊を意味する。スフェロイドを形成および／または維持することは、孤立細胞またはいびつなスフェロイドと比較して、前記スフェロイドの生理機能が生体組織により近いことを示す。

【００８６】

培養インスリン分泌細胞の生理機能を検査する方法としては、形態学的検査項目として下記４項目を５段階（１～５点）評価する方法が挙げられる（文献：Matsumoto Sら、Transplantation, 2002;74:1414.参照）

１．形状（shape）：

「扁平（flat）：１点」、「ほぼ扁平：２点」、「いびつな球状：３点」、「ほぼ球状：４点」、および「球状（spherical）：５点」の５段階評価する。この中では、「球状：５点」が最も好ましい。

２．辺縁の形状（border）：

「不ぞろいの（irregular）：１点」、「ほぼ不ぞろいの：２点」、「やや均整のとれた：３点」、「ほぼ均整のとれた：４点」、および「均整のとれた（well-rounded）：５点」の５段階評価する。この中では、「均整のとれた：５点」が最も好ましい。

３．統合性（integrity）：

「断片化した（fragmented）：１点」、「ほぼ断片化した：２点」、「ややソリッド／コンパクト：３点」、「ほぼソリッド／コンパクト：４点」、および「ソリッド／コンパクト（solid/compact）：５点」の５段階評価する。この中では、「ソリッド／コンパクト：５点」が最も好ましい。

４．直径（diameter）：

「スフェロイドの個々が１００μｍ未満（ａｌｌ＜１００μｍ）：１点」、「スフェロイドの個々が１００～１５０μｍ：２点」、「スフェロイドの個々が１２５～１７５μｍ：３点」、「スフェロイドの個々が１５０～２００μｍ：４点」、および「スフェロイドの個々中１０％以上が２００μｍより大きい（＞１０％＞２００μｍ）：５点」の５段階評価する。その中では、「スフェロイドの個々中１０％以上が２００μｍより大きい：５点」が最も好ましい。

５．染色の均一性（uniformity staining）：

「均一ではない（not uniform）：１点」、「ほぼ均一でない：２点」、「やや均一：

３点」、「ほぼ均一：４点」および「完全に均一（perfectly uniform）：５点」の５段階評価する。その中では、「完全に均一：５点」が最も好ましい。

【００８７】

本発明の分化誘導方法で得られるインスリン分泌細胞からなるスフェロイドは、形態学的には、形状が３点以上、辺縁の形状が３点以上、統合性が３点以上、直径が３点以上、染色の均一性が３点以上、評価値の合計が１５点以上であることが好ましく、形状が４点以上、辺縁の形状が４点以上、統合性が４点以上、直径が４点以上、染色の均一性が４点以上、評価値の合計が２０点以上であることがより好ましく、形状が５点、辺縁の形状が５点、統合性が５点、直径が５点、染色の均一性が５点、評価値の合計が２５点であることが最も好ましい。また、本発明の培養方法で得られるインスリン分泌細胞の機能は、グルコース刺激に対してインスリン分泌が低グルコース時と比べ、高グルコース時に１．５倍以上になることが好ましく、２倍以上になることがより好ましく、５倍以上になることが最も好ましい。

【００８８】

上記検査項目において、形状が「扁平」とは細胞を楕円状の球体とみなした際に、長軸／短軸比が１０以上であることを示し、「ほぼ扁平」とは前記長軸／短軸比が５以上１０未満であることを示し、「いびつな球状」とは前記長軸／短軸比が２以上５未満であることを示し、「ほぼ球状」とは前記長軸／短軸比が１．２以上２未満であることを示し、「球状」とは前記長軸／短軸比が１．２未満であることを示す。

【００８９】

辺縁の形状が「不ぞろいの」とはスフェロイドの辺縁の９割以上がでこぼこしており滑らかさを欠いた辺縁であることを示し、「ほぼ不ぞろいの」とはスフェロイドの辺縁の５割以上～９割未満が不ぞろいであることを示し、「やや均整のとれた」とはスフェロイドの辺縁の２割以上～５割未満が不ぞろいであることを示し、「ほぼ均整のとれた」とはスフェロイドの辺縁の１割以上～２割未満が不ぞろいであることを示し、「均整がとれた」とはスフェロイドの辺縁の１割未満が不ぞろいであることを示す。

【００９０】

統合性が「断片化した」とはスフェロイドの中にくびれがあるものが全体の８割以上であることを示し、「ほぼ断片化した」とはスフェロイドの中にくびれがあるものが全体の６～８割であることを示し、「ややソリッド／コンパクト」とはスフェロイドの中にくびれがあるものが全体の４～６割であることを示し、「ほぼソリッド／コンパクト」とはスフェロイドの中にくびれがあるものが全体の２～４割であることを示し、「ソリッド／コンパクト」とはスフェロイドの中にくびれがあるものが全体の２割以下であることを示す。

【００９１】

直径について、「スフェロイドの個々が１００μ未満」とはスフェロイド個々の直径が全て１００μｍ未満であることを示し、「スフェロイドの個々が１００～１５０μｍ」とはスフェロイド個々の直径が１００～１５０μｍの範囲であることを示し、「スフェロイドの個々が１２５～１７５μｍ」とはスフェロイド個々の直径が１２５～１７５μｍの範囲であることを示し、「スフェロイドの個々が１５０～２００μｍ」とはスフェロイド個々の直径が１５０～２００μｍの範囲であることを示し、「スフェロイドの個々中１０％以上が２００μｍより大きい」とはスフェロイド個々中１０％以上が２００μｍより大きいことを示す。

【００９２】

グルコース刺激に対するインスリン分泌（グルコース応答性インスリン分泌とも言う）とは、インスリン分泌細胞が、例えば培地中において低グルコース濃度から高グルコース濃度への変化（グルコース刺激）を感知してインスリン分泌を促進させることを言う。インスリンは、血糖を下げる方向に作用する唯一のホルモンであり、血中のグルコース濃度に応答して膵臓のランゲルハンス島（膵島）のβ細胞から分泌される。インスリン分泌細胞の機能が良好であれば、グルコース濃度の変動に応じて、適切にインスリンが分泌され

るが、インスリン分泌細胞の機能が不良であれば、こうしたグルコース応答性が不良となる。インスリン分泌細胞では、細胞の機能を評価するために、高グルコース濃度時に分泌されるインスリン分泌量に対する低グルコース濃度時に分泌されるインスリン分泌量の比率（高グルコース濃度時のインスリン分泌量／低グルコース濃度時のインスリン分泌量）（stimulation index；ＳＩ）として表し比較検討されており（Bergert H, Knoch KP, Meisterfeld R, Jager M, Ouwendijk J, Kersting S, Saeger HD, Solimena M,. Effect of oxygenated perfluorocarbons on isolated rat pancreatic islets inculture. Cell Transplant. 2005;14(7):441-8参照）、ＳＩ値が１．５以上であることが好ましく、２以上であることがより好ましく、５以上であることが最も好ましい。

【００９３】

高グルコース培養とは、培地中のグルコース濃度が３６００ｍｇ／Ｌ～４５００ｍｇ／Ｌであり、低グルコース培養とは、培地中のグルコース濃度が６００ｍｇ／Ｌ～１０００ｍｇ／Ｌである培養条件を示す。

【００９４】

本発明においては、アクチビンを用いて未分化なＥＳ細胞から分化させた胚体内胚葉を、馴化培地を用いてニューロジェニン３発現細胞へ分化させたのちに該細胞を高グルコース培地で刺激することにより、インスリン分泌細胞へ効率的に分化誘導を行なうことで、分化誘導効率が高く、高いインスリン分泌能を有するインスリン分泌細胞が大量に供給できる。これを糖尿病治療剤、バイオ人工膵臓、研究試薬または創薬モデル動物の細胞源とすることで万人が恩恵を受けることができる糖尿病治療剤、バイオ人工膵臓、研究試薬または創薬モデル動物の開発が大いに期待できる。

【００９５】

よって、本発明のもう１つの態様は、ＥＳ細胞から分化誘導させたインスリン分泌細胞を含有する糖尿病治療剤、バイオ人工膵臓、研究試薬および創薬モデル動物である。

【００９６】

本明細書において糖尿病治療剤とは、インスリン分泌細胞をそのまま、もしくはフィルター濾過などにより濃縮したペレットなどの細胞塊などがあげられる。さらに、前記糖尿病治療剤は、ＤＭＳＯなどの保護剤を加え、凍結保存することもできる。糖尿病治療剤として、より安全に利用するために、加熱処理、放射線処理、あるいはマイトマイシンＣ処理など、糖尿病治療剤としての機能を残しつつ、病原体のタンパク質が変性する程度の条件下で処理をすることができる。

【００９７】

前記インスリン分泌細胞を用いた糖尿病治療剤のヒトへの投与形態（移植方法）としては、例えば、ヒト患者の右下腹部に小切開を置き、腸間膜の細い血管を露出して直視下にカテーテルを挿入して細胞を移植する方法、エコーにて肝臓の門脈を同定して、カテーテルを穿刺して細胞を移植する方法、または腹部エコーガイド下に脾臓を直接穿刺することにより脾臓に移植する方法（Nagata H, Ito M, Shirota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ: Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. Transplantation, 76(4):732-4, 2003.参照）が挙げられる。なかでも、エコーにて細胞移植を行なう方法の方が、侵襲が少ないため好ましく、腹部エコーガイド下に脾臓を直接穿刺することにより脾臓や肝臓に移植する方法があり、肝臓が最も好ましい。細胞製剤の投与量（移植量）は、1×10^{8}～1×10^{10}細胞／個体が好ましく、5×10^{8}～1×10^{10}細胞／個体がさらに好ましく、1×10^{8}～1×10^{10}細胞／個体が最も好ましい。また、投与量（移植量）は、投与される患者の年齢、体重、症状などによって適宜変更することができる。

【００９８】

前記インスリン分泌細胞を用いた糖尿病治療剤のマウスへの投与形態（移植方法）としては、例えば、マウスを切開して腎皮膜下に移植する方法が挙げられる。細胞製剤の投与量（移植量）は、3×10^{6}～1×10^{7}細胞／個体が好ましく、4×10^{6}～8×10^{6}細胞／個体がさらに好ましく、5×10^{6}細胞／個体が最も好ましい。

【００９９】
本発明のバイオ人工膵臓を製造する場合、不織布などのスキャフォールドを使用することで細胞を三次元培養することが好ましい。近年、スキャフォールド上で細胞を三次元培養することでより生体内環境に近い条件を作ることができ細胞機能が向上することが知られてきており、不織布などのスキャフォールド上で細胞を培養することが機能の向上に有効である。また、インスリン分泌細胞を高分子素材で作製したデバイス中に封入して免疫系から隔離した状態で生着させることが可能なため、バイオ人工膵臓を使用する患者の身体的負担が軽減される。したがって、本発明のバイオ人工膵臓は２１世紀の糖尿病治療における中心的役割を果たすものとして期待される。

【０１００】
バイオ人工膵臓としては、中空糸型のリアクター（デバイス）と分離・培養細胞を組み合わせたハイブリッド型の人工膵臓などが挙げられる。バイオ人工膵臓は、体外に装着して血管に接続するもの、体内に留置して血管に接続するもの、または血管に接続せずに腹腔内に留置するものの、血管に接続せず皮下に留置する４つの形態がある。本発明のインスリン分泌細胞は、いずれの形態のバイオ人工膵臓にも使用可能であるが、ＥＳ細胞は、分化誘導すると増殖能力を失うが、分化が不充分であったＥＳ細胞が遺残した場合、細胞を生体内に移植すると奇形種を発症する可能性があるため、細胞移入などに伴う危険性を回避し、任意にリアクターを取り出せると言う点から皮下埋め込み体内型であることが好ましい。

【０１０１】
バイオ人工膵臓の開発においては、リアクターの設計・開発も重要な要素である。バイオリアクターとしては、体内に留置して使用するバッグ型人工膵臓（たとえば、Alejandro Soto-Gutierrez, Naoya Kobayashi, Jorge David Rivas-Carrillo, Nalu Navarro-Alvarez, Debaio Zhao, Teru Okitsu, Hirofumi Noguchi, Hesham Basma, Yashuhiko Tabata, Yong Chen, Kimiaki Tanaka, Michiki Narushima, Atsushi Miki, Tadayoshi Ueda, Hee-Sook Jun, Ji-Won Yoon, Jane Lebkowski, Noriaki Tanaka & Ira J Fox、「Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes」nature biotechnology、Volume24、No.11、pp1412 - 1419(Published online: 05 November 2006 | doi:10.1038/nbt1257）参照。以下「ＳＧ文献」と言うこともある。当業者であれば、ＳＧ文献を参照することで、バッグ型人工膵臓を製造することが可能である。）、サーシ　バイオメディカル社（Circe Biomedical Inc.）（レキシントン、マサチューセッツ州、米国）の支援下でシダーズサイナイ医療センター（Cedars-Sinai Medical Center）（ロサンジェルス、カリフォルニア州、米国）のディメトリュー（Demetriou）らを中心としたブタ肝細胞を用いたバイオ人工肝臓治療用のヘパトアシスト（HepatAssist）（Hui T, Rozga J, Demetriou AA. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2001; 8: 1-15.）や、ブタ肝細胞を使用したドイツのゲルラック（Ｇｅｒｌａｃｈ）らのＭＥＬＳ（モジュラー体外肝臓システム（Modular Extracorporeal Liver System））など、様々なタイプが知られている。これらのリアクターは、もちろん本発明において使用することができるが、インスリン分泌細胞が付着するための足場が無いため、細胞はただ単に、中空糸内スペースか、中空糸外スペースに充填されるのみで浮遊した状態となる傾向がある。インスリン分泌細胞は、浮遊状態では、分化機能が充分に発現されない傾向があり、さらに周りの細胞と衝突し、ストレス刺激を受けやすい。

【０１０２】
したがって、本発明においては、インスリン分泌細胞に足場が提供できるよう、中空糸と不織布などのスキャフォールドからなるリアクターが好ましい。

【０１０３】
中空糸膜としては、膜表面に細胞が付着して物質交換が妨げられることがなければどのようなものでも使用することができ、具体的には、従来医療用に用いられている市販の物、たとえば、ポリスルフォン膜、エチレン－酢酸ビニルランダム共重合体けん化物膜（たとえば、商品名：エバール、クラレメディカル株式会社製など）などが好ましい。市販の

中空糸膜のポアサイズは、その用途から透析膜（～５ｎｍ）、血漿成分分離膜（２０～３０ｎｍ）、血漿分離膜（３０～２００ｎｍ）などがある。物質の透過性の点からは、血漿分離膜（３０～２００ｎｍ）が好ましい。拒絶反応の危険性を回避するため、中空糸内を流れる血液中の免疫担当細胞や免疫グロブリンが中空糸外の不織布などのスキャフォールド上に充填した細胞と直接接触することがないよう、３０～１００ｎｍのポアサイズが最も好ましい。

【０１０４】

不織布としては、細胞が接着することが出来るように加工・修飾されているものが好ましい。不織布の線維としては、ポリ四フッ化エチレン（ＰＴＦＥ）などが挙げられる。なかでも、その加工のしやすさの点から、ポリ四フッ化エチレンにポリアミノ酸ウレタン（ＰＡＵ）加工を施したものが好ましい。

【０１０５】

本発明のバイオ人工膵臓の一実施態様を図８に示す。バイオ人工膵臓は、免疫担当細胞の透過を阻止するためのポリエチレン－ビニルアルコール膜（ポアサイズは３０ｎｍ）（例えば、エバール膜）５、細胞接着のためのＰＡＵ加工したＰＴＦＥ不織布６、およびインスリン分泌細胞７を注入する細胞注入口３および蓋４からなる。ＰＴＦＥ不織布６はポリエチレン－ビニルアルコール膜５に覆われた２層構造となっている。球状（スフェロイド）を呈しているインスリン分泌細胞７はＰＴＦＥ不織布に付着して存在し、バイオ人工膵臓内部に留まることが可能である。このバイオ人工膵臓を体内に埋め込むと、ポリエチレン－ビニルアルコール膜の周囲に血管が伸びてきて、バイオ人工膵臓内の細胞の栄養供給が可能となる。ＰＥメッシュを有しないポリエチレン－ビニルアルコール膜の外側にさらにＰＥメッシュ（ポアサイズは約１００ｎｍ）で覆われた３層構造から構成されるリアクターも可能である。３層構造の場合、ＰＥメッシュ内に血管が伸びてきて、バイオ人工膵臓内の細胞の栄養供給が可能となる。好ましい態様としては、図８に示す２層構造のバイオリアクターが挙げられる。２層のバイオリアクターは、ＰＥメッシュがない分、注入されたインスリン分泌細胞とポリエチレン－ビニルアルコール膜の周囲に誘導された血管がより近くに位置するため、血糖値のコントロールが容易となるため好ましい。なお、当該人工膵臓は、「ＳＧ文献」を参照することにより当業者であれば作製することが可能である。

【０１０６】

バイオリアクターに細胞または細胞培養物を充填させる方法としては、例えば、バイオリアクターをあらかじめ体内に埋め込んでおき、その後インスリン分泌細胞を充填させる方法、試験管内で細胞を分化誘導しＥＳ細胞をインスリン分泌細胞としたのちに、必要な細胞数をバイオリアクターに充填させる方法と、バイオリアクター内部をマトリゲルなどのスキャフォールドであらかじめ加工しておき、そのなかでインスリン分泌細胞を分化誘導する方法とがある。バイオリアクターが、バック型である場合、バック型バイオリアクターをあらかじめ体内に埋め込んでおき、バイオリアクターの周辺に血管が伸長してから、インスリン分泌細胞をバイオリアクターに充填させる方法が好ましい。いずれの場合も、細胞の充填には、細胞懸濁液を１０～５０ｍＬの注射器を使用して、リアクターに装着されている細胞注入口より注入することが好ましい。

【０１０７】

また、このようなバイオリアクターを使用するバイオ人工臓器による治療は、体外で使用する場合は、安全かつ科学的に施行するために、１）人工臓器リアクターの流入圧と流出圧のリアルタイムでのモニタリング、２）気泡が発生した際のアラームの作動、３）リアクターの温暖化（３７℃）などができる機能を一体化した装置で実施されることが好ましい。

【０１０８】

本発明のバイオリアクターはまた、有用物質生産、組織や器官・臓器の機能の調査・探索、新薬のスクリーニングや内分泌撹乱物質等の影響を評価するための動物実験代替法等にも好適に適用できる。

【０１０９】
本発明のバイオ人工膵臓は、例えば、膵島に本来備わっている産生成分であるインスリンの製造に使用することができる。インスリンの製造は、得られた培地をアフィニティーカラムなど、通常タンパク質の精製に使用される方法によって精製することにより行なうことができる。
【０１１０】
本発明のバイオ人工膵臓は、例えば、国内のみならず国際的にも年々増加の一途をたどっている糖尿病患者に移植が可能である。ヒト糖尿病の予防と制圧が、２１世紀における人類の大きな課題であるといっても過言ではない。そこで、多くの製薬メーカーが糖尿病薬の開発に取り組んでいる。
【０１１１】
本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞を含有する研究試薬は、例えば、新薬のスクリーニングに用いる研究試薬を意味する。当該研究試薬は、どのような態様で用いてもよいが、インスリン分泌細胞を培養している培養容器にそのまま新薬などを添加し評価する方法、バイオリアクター内に当該細胞を封じ込めて評価する方法などが挙げられる。本明細書では、新薬のかわりに血糖降下薬として市販されているトルブタミドを用いて薬効評価を行うことで本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞が研究試薬としても有用であることを示す。
【０１１２】
トルブタミドとは、スルフォニル尿素系の血糖降下薬である。トルブタミドは、膵臓に働きかけインスリンの分泌を増やすことで、血糖値を低下させる作用を有する。おもに、２型糖尿病（インスリン非依存型糖尿病）に用いられる。薬理作用は、膵臓にあるランゲルハンス島のβ細胞を刺激してインスリン分泌を促進する（膵作用）。ただし、インスリンの代わりにはならないので、インスリンがまったく分泌されない１型糖尿病（インスリン依存型糖尿病）には無効である（http://www.interq.or.jp/ox/dwm/se/se39/se3961006.html参照）。
【０１１３】
近年、トラスジェニック（Ｔｇ）動物の作成が容易になり、種々のユニークな特性を持つ糖尿病Ｔｇ動物が誕生している。これらのＴｇ動物の場合、系統の確立、維持、繁殖、供給は大変な作業である。モデル動物の確立には多年月と多大な労力・忍耐がかかり、近年のように時の流れが速くなる中、なかなかじっくりと取り組める課題ではなくなってきている。さらに、系統の繁殖・維持にはマンパワーと設備が必要であり、役割が終了したモデル動物の場合、消滅してしまう危険もある。また、ヒト糖尿病と糖尿病モデル動物との相違点から、開発医薬品の臨床試験段階でのドロップアウトが多いのが問題となっている。本発明のバイオ人工膵臓は、こうした問題点を解決できるため好ましい。
【０１１４】
本明細書において創薬モデル動物とは、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞を含有する動物を言う。例えば、ヒト由来のインスリン分泌細胞を有するキメラマウスが挙げられ、ヒト膵島に対する創薬および薬理試験等に用いることができる。
【０１１５】
以下、本発明をヒト由来のＥＳ細胞を用いた実施例をあげて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。
【実施例】
【０１１６】
製造例１
ＥＳ細胞の調製
１２９ｖマウス由来のＥＳ細胞（大日本住友製薬株式会社より購入）を、ネオマイシン耐性遺伝子が導入されているフィーダー細胞（マウス由来の胚性線維芽細胞、大日本住友製薬株式会社より購入）を用いて、０．１％ゼラチン水（カタログ番号：Ｒ－ＥＳ－００６Ｂ、大日本住友製薬株式会社より購入）でコートした培養フラスコＴ－７５（ファルコ

ン社製、ベクトン　デッキンソン　アンド　カンパニー（Becton, Dickinson and Company）販売）を使用して培養した。細胞培養用培地には、ＥＳ培養液（Ｒ－ＥＳ－１０１：大日本住友製薬株式会社より購入）：ダルベッコ改変イーグル（ＤＭＥＭ）培養液の混合液（１：１容量比）に１５％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、１％非必須アミノ酸、１％ヌクレオシド、１１０μｍｏｌ／Ｌ　２－メルカプトエタノール（大日本住友製薬株式会社より購入）、１％ペニシリンおよびストレプトマイシン、１％グルタミン酸、ならびに５００Ｕ／ｍＬマウス由来白血病抑制因子（ＬＩＦ）（大日本住友製薬株式会社より購入）を添加したものを使用した。培養液は毎日交換し、ＥＳ細胞は、３日毎に継代した。培養プレート中にＥＳ細胞が占める割合が８０～９０％の状態になったところで、２段階式処置にて、すなわち、まず、０．２５％濃度のトリプシン－ＥＤＴＡ（インビトロジェン社製）を添加し、４５秒間経過後、トリプシン－ＥＤＴＡ液を取り除くことでフィーダー細胞を一緒に除去し（ＥＳ細胞はまだこの段階では培養プレートに残っている）、ついでその２分後にＥＳ培養液を加え剥離することによって、培養プレートに残っているＥＳ細胞を回収した。

【０１１７】

実施例１

工程（ａ）：未分化ＥＳ細胞の胚体内胚葉への分化

製造例１で得られた未分化ＥＳ細胞は、細胞培養濃度を少なくし（細胞培養濃度：１７５，０００細胞／ｍＬ）、コラーゲンタイプＩＶ、マトリゲル、ラミニンタイプ１、ジェラチンのいずれかで加工した培養皿を用いてアクチビンＡ（Activin A、カタログ番号：３３８－ＡＣ、Ｒ＆Ｄ社製）（０ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ、または２００ｎｇ／ｍＬ）、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ－２、カタログ番号：２３３－ＦＢ／ＣＦ、Ｒ＆Ｄ社製）（２０ｎｇ／ｍＬ）、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、およびウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を加えたエス・クロンＳＦ－０３培地（製品番号ＳＳ－１３０３、三光純薬株式会社製）で計２日間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）を行った。２日間の培養におけるウシ胎仔血清およびウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）の濃度は次のように変化させた。すなわち０．２％ＦＢＳおよび２．５％ＢＳＡで１２時間培養、１％ＦＢＳおよび２．５％ＢＳＡで１２時間培養後３％ＦＢＳおよび２．５％ＢＳＡで２４時間ＥＳ細胞を培養した。当該胚体内胚葉への分化判定には、Ｆｏｘａ２とＳｏｘ１７の遺伝子発現をＲＴ－ＰＣＲ法にて判定した。

【０１１８】

試験例１

誘導された胚体内胚葉における遺伝子発現

実施例１に記載の分化誘導された胚体内胚葉において、ＲＴ－ＰＣＲ法により、胚体内胚葉特異的な遺伝子であるＦｏｘａ２およびＳｏｘ１７遺伝子の発現を調べた。内因性コントロールとしてＧＡＰＤＨ遺伝子の発現も調べた。ＲＴ－ＰＣＲ法では、細胞を０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ（インビトロジェン社製）で処理したのちに回収し、ＲＮＡトリゾール（インビトロジェン社製）を用いて製品の取扱説明書にしたがってＲＮＡを抽出した。抽出したＲＮＡ２μｇを用いてＲＮＡ逆転写酵素による逆転写反応（２２℃で１０分、さらに４２℃２０分、９９℃５分、その後４℃で５分以上静置）を行った。

【０１１９】

得られた２μｇの逆転写産物を、各プライマー２０ｐｍｏｌ／ｍＬで、ＡｍｐｌｉＴａｇ　Ｇｏｌｄキット（パーキン－エルマー／シータス社、ノーウォーク、コネチカット州、米国）を用い、そのプロトコールにしたがってＰＣＲ増幅に用いた。ＰＣＲ反応は、９５℃１０分、それから各サイクルで９５℃３０秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒をサイクル数だけ繰り返した。その後、４℃で５分以上静置した。各遺伝子に対するプライマーおよびＰＣＲ条件を以下に記載する。

【０１２０】

Ｆｏｘａ２遺伝子（２８８ｂｐ、６０℃、３０サイクル）

５′プライマー：５′－ＴＧＧＴＣＡＣＴＧＧＧＧＡＣＡＡＧＧＧＡＡ（配列番号１）

３′プライマー：５′－ＧＣＡＡＣＡＡＣＡＧＣＡＡＴＡＧＡＧＡＡＣ （配列番号２）
Ｓｏｘ１７遺伝子（２１０ｂｐ、６０℃、３５サイクル）
５′プライマー：５′－ＧＣＣＡＡＡＧＡＣＧＡＡＣＧＣＡＡＧＣＧＧＴ（配列番号３）
３′プライマー：５′－ＴＣＡＴＧＣＧＣＴＴＣＡＣＣＴＧＣＴＴＧ（配列番号４）

【０１２１】

当該胚体内胚葉への分化判定には、Ｆｏｘａ２とＳｏｘ１７の遺伝子発現をＲＴ－ＰＣＲ法にて判定した。レーン１から４は、それぞれ、コラーゲンタイプＩＶ、マトリゲル、ラミニンタイプ１、ジェラチンを示す。コラーゲンタイプＩＶにて、胚体内胚葉特異的なマーカー遺伝子であるＦｏｘａ２およびＳｏｘ１７遺伝子の発現が最も強く確認される。この結果は、本手法により胚体内胚葉の分化誘導が効率よく誘導できることを強く支持している。図２にコラーゲンタイプＩＶにて同様に未分化マウスＥＳ細胞を培養した際のＦｏｘａ２とＳｏｘ１７の遺伝子発現を示す。この場合は、アクチビンＡを各種濃度で添加した。レーン１から４は、それぞれ、アクチビンＡの濃度が２ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌ、１００ｎｇ／ｍｌ、２００ｎｇ／ｍｌである。アクチビンＡの濃度が１０ｎｇ／ｍｌが最も好ましく、１００ｎｇ／ｍｌが次いで好ましく、２００ｎｇ／ｍｌが次いで好ましい。図１、２の結果は未分化マウスＥＳ細胞をコラーゲンタイプＩＶにて、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ－２）（２０ｎｇ／ｍＬ）、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、およびウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を加えたエス・クロンＳＦ－０３培地（製品番号ＳＳ－１３０３、三光純薬株式会社製）で計２日間、アクチビンＡの濃度が１０ｎｇ／ｍｌで培養することで、胚体内胚葉の分化誘導が効率よく誘導できることを強く支持している。従来技術であるダムール法では、工程（ａ）の分化誘導は１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡが必要であること、低濃度（３０ｎｇ／ｍＬ）のアクチビンＡでは分化誘導効率が低いことが記載されている（ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.参照）。本発明の分化誘導方法の工程（ａ）では、従来技術であるダムール法と比較して低濃度のアクチビンＡでもＥＳ細胞を分化誘導しうることが明らかとなった。

【０１２２】

実施例２

工程（ｂ）：原始膵の形成

実施例１に記載の分化誘導を２日間行った後に、工程（ａ）で得た胚体胚様体を用いて原始膵の形成を行った。ヒト神経膠芽細胞腫由来細胞株Ｔ９８Ｇ（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１６９０、ＡＴＣＣ（米国）から入手可能）をＳＦ－０３培地で１日間培養（細胞培養濃度：8×10^{5}細胞／ｍＬ、培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）して得られた馴化培地を使用して、工程（ａ）で得られた胚体内胚葉を５日間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）した。上記馴化培地には、レチノイン酸（１μｍｏｌ／Ｌ、１０μｍｏｌ／Ｌ、１００μｍｏｌ／Ｌまたは１０００μｍｏｌ／Ｌ）およびＦＧＦ－２（２０ｎｇ／ｍＬ）を添加し、コラーゲンタイプＩＶ加工培養皿Ｔ－２５フラスコ（細胞培養濃度１７５，０００細胞／ｍＬ、計７００，０００細胞）を使用した。工程（ｂ）で得た細胞には、Ｆｏｘａ２（＋）、Ｓｏｘ１７（＋）、Ｐｄｘ－１（＋）、Ｓｈｈ（－）の遺伝子発現を示しており、ＥＳ細胞が原始膵への形成を開始していることが確認された。

【０１２３】

試験例２

誘導された原始膵における遺伝子発現

実施例２に記載の誘導された原始膵において、ＲＴ－ＰＣＲ法により、原始膵特異的な遺伝子であるＰｄｘ－１遺伝子とＳｈｈ遺伝子の発現を調べた。内因性コントロールとしてＧＡＰＤＨ遺伝子の発現も調べた。また、胚発生の時期に特異的に発現する遺伝子であるＳｈｈ遺伝子の発現も調べた。ＲＴ－ＰＣＲ法では、細胞を０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ（インビトロジェン社製）で処理したのちに回収し、ＲＮＡトリゾール（インビト

ロジェン社製）を用いて製品の取扱説明書にしたがってＲＮＡを抽出した。抽出したＲＮＡ２μｇを用いてＲＮＡ逆転写酵素による逆転写反応（２２℃で１０分、さらに４２℃２０分、９９℃５分、その後４℃で５分以上静置）を行った。

【０１２４】

得られた２μｇの逆転写産物を、各プライマー２０ｐｍｏｌ／ｍＬで、ＡｍｐｌｉＴａｇ　Ｇｏｌｄキット（パーキンーエルマー／シータス社、ノーウォーク、コネチカット州、米国）を用い、そのプロトコールにしたがってＰＣＲ増幅に用いた。ＰＣＲ反応は、９５℃１０分、それから各サイクルで９５℃３０秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒をサイクル数だけ繰り返した。その後、４℃で５分以上静置した。各遺伝子に対するプライマーおよびＰＣＲ条件を以下に記載する。

【０１２５】

Ｐｄｘ－１遺伝子（４５１ｂｐ、６０℃、４０サイクル）

５′プライマー：５′－ＡＣＣＡＴＧＡＡＣＡＧＴＧＡＧＧＡＧＣＡ（配列番号５）

３′プライマー：５′－ＴＣＣＴＣＴＴＧＴＴＴＣＣＴＣＧＧＧＴ（配列番号６）

Ｓｈｈ遺伝子（２４８ｂｐ、６０℃、３５サイクル）

５′プライマー：５′－ＣＣＴＣＴＣＣＴＧＣＴＡＴＧＣＴＣＣＴＧ（配列番号７）

３′プライマー：５′－ＧＴＧＧＣＧＧＴＴＡＣＡＡＡＧＣＡＡＡＴ（配列番号８）

ＧＡＰＤＨ遺伝子（１７１ｂｐ、６０℃、３５サイクル）

５′プライマー：５′－ＡＣＣＣＡＧＡＡＧＡＣＴＧＴＧＧＡＴＧＧ（配列番号９）

３′プライマー：５′－ＣＡＣＡＴＴＧＧＧＧＧＴＡＧＧＡＡＣＡＣ（配列番号１０）

【０１２６】

結果を図３に示す。レーン　１～４は、それぞれレチノイン酸濃度が１μＭ　、１０μＭ、１００μＭ、１０００μＭを示す。１０μＭのレチノイン酸では、原始膵においては、原始膵特異的なマーカー遺伝子であるＰｄｘ－１遺伝子の発現が強く確認されるが、Ｓｈｈは発現していなかった。この結果は、本手法により原始膵の分化誘導が効率よく誘導できることを強く支持している。

【０１２７】

実施例３

工程（ｃ）ニューロジェニン３発現細胞の選別

工程（ｂ）で得られた原始膵を馴化培地を用いて培養することによりニューロジェニン３発現細胞を増加させた。ヒト不死化肝類洞内皮細胞株ＴＭＮＴ－１細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６（郵便番号３０５－８５６６）、寄託日：平成１４年４月１６日、受託番号：ＦＥＲＭ　ＢＰ－８０１７、万人が使用できる）を低グルコースＤＭＥＭ培地（グルコース濃度：１０００ｍｇ／Ｌ、カタログ番号３１６００－０８３、インビトロジェン社製）で１日間培養（細胞培養濃度：8×10^5細胞／ｍＬ、培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）して得られた馴化培地にγ－セクレターゼインヒビターＸＶＩＩＩ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ社（カタログ番号５６５７７９）、またはＡｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ社（カタログ番号：ＡＬＸ－２７０－４１５－Ｃ２５０、またはＡＬＸ－２７０－４１５－Ｍ００１）から購入可能）、ＦＧＦ－２（２０ｎｇ／ｍＬ）、ＥＧＦ（２０ｎｇ／ｍＬ）を添加したものを使用して、ラミニン－１（濃度は５μｇ／cm^2）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、カタログ番号：３５４２３２）で加工した培養皿Ｔ－２５フラスコ（細胞培養濃度５０，０００細胞／ｍＬ、計２００，０００細胞）でニューロジェニン３発現細胞を４日間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）して誘導した。ニューロジェニン３発現細胞の選別には、ニューロジェニン３遺伝子のプロモーターの下流に増強黄色蛍光タンパク質（ｅＹＦＰ）をコードしている遺伝子を導入しｅＹＦＰ発現細胞を指標としてセルソーター（ＭｏＦｌｏ）を用いて選別した。ｅＹＦＰ遺伝子の導入には、Ｎｇｎ３プロモーター下にｅＹＦＰ（enhanced yellow fluorescence；増強黄色蛍光タンパク質）を発現するプラスミドベクター：ｎｇｎ３－Ｓｐｅｌ－ｅＹＦＰ（以下の論文から当該プラスミドベクターは入手可能である。Mellitzer G, Martin M, Sidhoum

-Jenny M, Orvain C, Barths J, Seymour PA, Sander M, Gradwohl G. Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice.Mol Endocrinol.18(11):2765-76.2004）を用いた。その後、一過性にｎｇｎ３－Ｓｐｅｌ－ｅＹＦＰをＮｕｃｅｌｏｆｅｃｔｏｒ（Ａｍａｘａ社、取り扱い規約に則れば万人が使用可能である）を使用して導入した。ベクター：ｎｇｎ３－Ｓｐｅｌ－ｅＹＦＰ（Mellitzer Gら、Mol. Endocrinol. (2004) Nov;18(11):2765-76参照。Ｍｅｌｌｉｔｚｅｒからベクターを万人が提供を受けることができる。）をヌクレオフェクター（Ａｍａｘａ社製、操作方法は以下のホームページを参照http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/gene/article/amaxa/pdf/Manual.pdf）を用いて遺伝子導入（細胞培養濃度：５×１０^{5}細胞／ｍＬ、培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）した。４８時間後に、当該細胞を、セルソーターＭｏＦｌｏを使用してｅＹＦＰの発現を検討したところ、原始膵の３分の１がｅＹＦＰを発現していた。ｅＹＦＰ発現細胞（ニューロジェニン発現細胞）をＭｏＦｌｏを使用して回収した。そして、Ｎｇｎ３発現細胞をＭｏＦｌｏ（Ｄａｋｏ－Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ社、取り扱い規約に則れば万人が使用可能である）を使用して回収した。

【０１２８】

製造例２

ＲＣＮＫ－１細胞株の樹立

カナダのアルバータ大学から提供された健常分離ヒト膵島（カナダ、アルバータ大学、ヒト膵島移植プログラム、ジョナサン　レイキー（Jonathan RT. Lakey）博士より、万人が入手可能である）から、球形のきれいな形態を呈しているものを実体顕微鏡（ＳＴＥＭＩ、Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ社、ドイツ）下にｈａｎｄ　ｐｉｃｋｕｐ法にて１０個選別し、これをＴ２５培養フラスコに播いた。培養液は、ＣＭＲＬ１０６６、インビトロジェン社製）に１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ、シグマ社）、１０$^{-7}$ｍｏｌ／ｌインスリン（シグマ社）、１０$^{-6}$ｍｏｌ／ｌデキサメタゾン（シグマ社）、２５μｇ／ｍｌ上皮成長因子（ＥＧＦ、シグマ社）、１０ｍＭニコチンアミド（シグマ社）、抗生物質のペニシリンＧ／ストレプトマイシン（シグマ社）の組成のものを基本培養液として用いた。当該膵島を、ヌクレオフェクターシステム用緩衝液（Nucleofector™ Solution、和光純薬工業株式会社製）１ｍｌで希釈し、そこにｐＹＫ－１のプラスミドＤＮＡ（国際公開第２００５／１００５４６号パンフレットを参照）のＴＥ緩衝液（TE buffer、シグマ社製）の懸濁液（１μｇ／μｌ）２μｌを添加して、ヌクレオフェクターシステム（Nucleofector™ system、和光純薬工業株式会社製）により、該システムのプロトコールにしたがって遺伝子導入した。得られた細胞をＴ－２５フラスコに播種し、ＣＳ－Ｃ無血清培地（ＣＳ－ＳＦ－４Ｚ０－５００、大日本製薬株式会社販売）にて培養を継続した。遺伝導入して４８時間後に、１００μｇ／ｍｌのハイグロマイシン含有ＣＳ－Ｃ無血清培地にて、耐性クローンの選択を行なった。選択開始から２週間後に耐性クローンの出現を認め、４週間後にクローニングリングを使用し、ＲＣＮＫ－１細胞株を樹立した。

【０１２９】

実施例４

工程（ｄ）インスリン分泌細胞への分化

（ＤＭＥＭ培地を用いる方法）

工程（ｃ）で得られたニューロジェニン３発現細胞を、３％または５％のウシ胎仔血清（３％ウシ胎仔血清にて３日間、ついで５％ウシ胎仔血清にて４日間培養）、肝細胞増殖因子１０ｎｇ／ｍＬ、ニコチンアミド１０ｍｍｏｌ／Ｌ、エクスディン－４　１００ｎｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾン１０μｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛１６．７μｍｏｌ／Ｌを加えた低グルコースＤＭＥＭ培地を用いて７日間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）した。培養皿としては、マトリゲルで加工した６－ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅを使用した。工程（ｄ）においては、毎日、血清非添加の高グルコースＤＭＥＭ培地（グルコース濃度：４５００ｍｇ／Ｌ、カタログ番号：１２８００－０８２、インビトロジェン社製）にて２時間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）した後、前記低グルコースＤＭＥＭ培地で２２時間の培養を７日間継続した。なお、高グルコース培地にも肝細胞増殖因子１０ｎｇ／ｍＬ

、ニコチンアミド１０ｍｍｏｌ／Ｌ、エクスディン－４　１００ｎｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾン１０μｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛１６．７μｍｏｌ／Ｌを加えた。

【０１３０】

（ＲＣＮＫ－１馴化培地を用いる方法）

工程（ｃ）で得られたニューロジェニン３発現細胞を、低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地を用いてインスリン分泌細胞へ分化誘導を行った。ＲＣＮＫ－１細胞を低グルコースＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳで培養し、フラスコに一杯になった時点で核内限局信号（ＮＬＳ）標識されたＣｒｅ組換え酵素を産生する複製不可能な組換えアデノベクターＡｘＣＡＮＣｒｅ（3×10^{8}ｐｆｕ／ｍｌ）（理研ジーンバンクより入手可能、ＲＤＢ　Ｎｏ．１７４８）をＭＯＩ（感染多重度）＝１０～５０（１５が好ましい）で２～４時間（３時間が好ましい）感染させ、ＲＣＮＫ－１細胞をＣｒｅ／ｌｏｘＰシステムで不死化遺伝子のＳＶ４０Ｔを取り除いた（培養温度：３５～３７℃）。感染後は、ＲＣＮＫ－１細胞を低グルコースＤＭＥＭ＋５％ＦＢＳで２日間（４８時間）培養して、その後、低グルコースＤＭＥＭのみで培養した。２４時間培養した後に、当該低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地を回収した。なお当該操作は、無血清であるため細胞が弱るまで４回から５回可能である。当該低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地に３％または５％のウシ胎仔血清（３％ウシ胎仔血清にて３日間、ついで５％ウシ胎仔血清にて４日間培養）、肝細胞増殖因子１０ｎｇ／ｍＬ、ニコチンアミド１０ｍｍｏｌ／Ｌ、エクスディン－４　１００ｎｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾン１０μｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛１６．７μｍｏｌ／Ｌを加えた培地を用いて７日間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）した。低グルコースＲＣＮＫ－１馴化培地は、培養皿としては、マトリゲルで加工した６－ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅを使用した。工程（ｄ）においては、毎日、血清非添加の高グルコース濃度に調製したＫＲＢＢ培地（Krebs Ringer Balanced Buffered（ＫＲＢＢ）（１４３ｍＭ　Ｎａ，　５．８ｍＭ　Ｋ，　２．５ｍＭ　Ｃａ，　１．２ｍＭ　Ｍｇ２，　１２４．１ｍＭ　Ｃｌ，　１．２ｍＭ　ＰＯ－４，　１．２ｍＭ　ＳＯ－４，　２５ｍＭ　ＨＣＯ－３，　１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ，　０．２％　ＢＳＡを含む、以下の論文に詳細に書いてある。Srivastava S, Goren HJ.Insulin constitutively secreted by beta-cells is necessary for glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes. 2003 ;52(8):2049-56.参照））に肝細胞増殖因子１０ｎｇ／ｍＬ、ニコチンアミド１０ｍｍｏｌ／Ｌ、エクスディン－４　１００ｎｍｏｌ／Ｌ、トログリタゾン１０μｍｏｌ／Ｌ、硫酸亜鉛１６．７μｍｏｌ／Ｌを加えた培地で２時間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）した後、前記ＲＣＮＫ－１馴化培地で２２時間の培養を７日間継続した。

【０１３１】

実施例５

インスリン分泌細胞のＭａｆＡ遺伝子発現

本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞（工程（ｄ）の培養７日目）を位相差顕微鏡下にて観察した（図４（ａ）参照）。核１はドット状に赤く染まっており、直径が約２００μｍの球状を呈しているインスリン分泌細胞群全体２は緑に染まっていることからＭａｆＡ遺伝子の発現が確認できた。ＭａｆＡ遺伝子の発現は、ＭａｆＡ抗体を用いて行った（ＭａｆＡ抗体（ＢＬ１０６９、カタログ番号：Ａ３００－６１１Ａ、ＢＥＴＨＹＬ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ，ＩＮＣ．社製。使用方法に関しては、製品に添付の取扱説明書を参照）。なお、添付の写真は白黒２階調に変換したものであるので、染色された色は表現されていない。本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は、ＭａｆＡ遺伝子を発現する能力を有するのに対し、従来技術であるダムール法で分化誘導されたインスリン分泌細胞はＭａｆＡ遺伝子を発現していないことが報告されている（ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.参照）。この結果からも、本発明の分化誘導方法は従来技術と比較して優れていることが明らかとなった。本発明が優れている要因としては、ダムール法ではＦＧＦ－１０を使用しているのに対し、本発明では工程（ｃ）においてＥＧＦおよびＦＧＦ－２を使用した点が考えられる。ＦＧＦ－１０は、膵臓の発生過程でβ細胞への分化を抑制（ミラ

レスら、Int J Dev Biol. 2006;50(1):17-26.参照）し、膵外分泌細胞を誘導する（ブシュシャンら、Development. 2001;128(24):5109-17参照）ことが報告されている。一方、ＥＧＦとＦＧＦ－２が膵臓の発生過程でβ細胞への分化を促進する（Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. Diabetes. 2001 Jul;50(7):1571-9）ことが報告されている。

【０１３２】

実施例６

インスリン分泌細胞のインスリン分泌能の確認および形態学的検討

本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞の形態を位相差顕微鏡下にて観察した（図４（ｂ）参照）。なお、核１は赤く染まっており、分化誘導４、７日目においては直径が約２００μｍの球状を呈しているインスリン分泌細胞群全体２はインスリン分泌を示す緑に染まっている。インスリンの検出は抗インスリン抗体を用いて行った（Ｓｔａ．　Ｃｒｕｚ　ｓｃ－９１６８，使用方法は製品に添付させている取り扱い説明書を参照）。インスリン分泌細胞は培養日数の増加に伴い緑色を呈していることが確認された。なお、添付の写真は白黒２階調に変換したものであるので、染色された色は表現されていない。図４の写真右下のスケールバーは共に２００μｍを示す。インスリン分泌細胞は培養日数と共に球状の形態を形成してきている。

【０１３３】

分化誘導２日目の細胞の形態学検討

１．形状が「いびつな球状：３点」、２．辺縁の形状が「やや均整のとれた：３点」、３．統合性が「断片化した（fragmented）：１点」、４．直径が「培養膵島の個々が１２５～１７５μｍ：３点」、５．染色の均一性が「やや均一：３点」評価値の合計が１３点であった（図４参照）。

【０１３４】

分化誘導４日目の細胞の形態学検討

１．形状が「球状：５点」、２．辺縁の形状が「やや均整のとれた：３点」、３．統合性が「ややソリッド／コンパクト：３点」、４．直径が「培養膵島の個々中１０％以上が２００μｍより大きい：５点」、５．染色の均一性が「やや均一：３点」評価値の合計が１９点であった（図４参照）。

【０１３５】

分化誘導７日目の細胞の形態学検討

１．形状が「球状：５点」、２．辺縁の形状が「均整のとれた：５点」、３．統合性が「ソリッド／コンパクト：５点」、４．直径が「培養膵島の個々中１０％以上が２００μｍより大きい：５点」、５．染色の均一性が「完全に均一：５点」評価値の合計が２５点であった（図４参照）。一方、ダムール法により得られたインスリン分泌細胞は球状にはなっていなかった。

【０１３６】

ダムール法による細胞の形態学的検討

１．形状が「扁平：１点」、２．辺縁の形状が「不ぞろいの：１点」、３．統合性が「断片化した：１点」、４．直径が「培養膵島の全体が１００μｍ未満：１点」、５．染色の均一性が「やや均一：３点」評価値の合計が７点であった（ダムールら、Nat. Biotech., published online, 19 October 2006, doi: 10.1038/nbt1259.参照）。

形態学的検討結果より、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は従来技術（ダムール法）より優れていることが明らかとなった。

【０１３７】

実施例７

本発明の手法により得られたインスリン分泌細胞の機能評価

１）インスリン分泌

実施例４のＤＭＥＭ培地を用いた培養により得られたインスリン分泌細胞または実施例

４のＲＣＮＫ－１馴化培地を用いた培養により得られたインスリン分泌細胞を、それぞれＤＭＥＭ（図５（ａ）および表１（ａ）参照）またはＫＲＢＢ（図５（ｂ）および表１（ｂ）参照）に、３．３ｍＭ濃度（低グルコース）ないしは２５ｍＭ濃度（高グルコース）のグルコースを添加して、各２時間培養（培養温度：３７℃、ｐＨ：７．４）して、培地中のインスリン分泌量を測定し（Ｕｌｔｒａｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ｉｎｓｕｌｉｎ ｋｉｔ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ Ｕｌｔｒａｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｍｏｕｓｅ Ｉｎｓｕｌｉｎ ＥＬＩＳＡ、製品番号：１０－１１５０－０１、Ｍｅｒｃｏｄｉａ社製）従来技術（ダムール法、およびシュローダー法（シュローダーら、nature protocols vol.1, no.2, p.495-507, 2006））との比較を行った（図５、表１（ａ）および表１（ｂ）参照）。すなわち、低グルコースにて２時間刺激後高グルコースにて２時間刺激（「グルコース刺激：低→高」と略す）した後の培地中のインスリン分泌量を測定、または低グルコースにて２時間刺激後高グルコースにて２時間刺激後再度低グルコースにて２時間刺激（「グルコース刺激：低→高→低」と略す）した後の培地中のインスリン分泌量を測定した。その結果、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は、低グルコースＤＭＥＭで２日、４日、７日、と培養日数が増加するごとに、「グルコース刺激：低→高」した際のインスリン分泌量が増加しており（それぞれ、図５の横軸の１、３、５を参照。）、一方で「グルコース刺激：低→高→低」した際のインスリン分泌量は減少しており（それぞれ、図５の横軸の２、４、６を参照）、インスリン分泌細胞がグルコース応答性を有することが明らかとなった。なお比較として、従来技術であるシュローダー法によるインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（図５の横軸の７を参照）、ダムール法によるインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（図５の横軸の８を参照）、ダムール法によるインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高」した後の培地中のインスリン分泌量（図５の横軸の９を参照）、ダムール法によるインスリン分泌細胞を「グルコース刺激：低→高→低」した後の培地中のインスリン分泌量（図５の横軸の１０を参照）を測定した。その結果、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は、従来技術によるインスリン分泌細胞と比較して優れたインスリン分泌能を有し、グルコース応答性も優れていることが明らかとなった。

【０１３８】

【表１（ａ）】

表１（ａ）

実験 No.	1	2	3	平均	標準偏差
高グルコース濃度にて刺激したときのインスリン分泌量（ng／μg）					
本発明					
DMEMで2日間培養した細胞	0.25	0.20	0.34	0.26	0.06
DMEMで4日間培養した細胞	0.72	0.41	0.77	0.63	0.16
DMEMで7日間培養した細胞	1.79	1.08	1.45	1.44	0.29
従来技術					
シュローダー法で分化誘導したインスリン分泌細胞				0.03	0.00
ダムール法で分化誘導したインスリン分泌細胞	0.08	0.13	0.14	0.12	0.01
低グルコース濃度にて刺激したときのインスリン分泌量（ng／μg）					
本発明					
DMEMで2日間培養した細胞	0.19	0.21	0.26	0.22	0.03
DMEMで4日間培養した細胞	0.29	0.33	0.49	0.37	0.09
DMEMで7日間培養した細胞	0.81	0.44	0.57	0.61	0.15
従来技術					
シュローダー法で分化誘導したインスリン分泌細胞				0.02	0.00
ダムール法で分化誘導したインスリン分泌細胞	0.06	0.09	0.12	0.09	0.02
	100pM	150pM	200pM		
本発明と従来技術との比較					
インスリン分泌量の比率（高グルコース濃度）					
本発明（DMEMで2日間培養した細胞）／シュローダー法	9.81				
本発明（DMEMで4日間培養した細胞）／シュローダー法	23.50				
本発明（DMEMで7日間培養した細胞）／シュローダー法	53.42				
インスリン分泌量の比率（低グルコース濃度）					
本発明（DMEMで2日間培養した細胞）／ダムール法	2.28				
本発明（DMEMで4日間培養した細胞）／ダムール法	5.47				
本発明（DMEMで7日間培養した細胞）／ダムール法	12.43				

【０１３９】

【表１（ｂ）】

表１（ｂ）

実験 No.	1	2	3	平均	標準偏差
高グルコース濃度にて刺激したときのインスリン分泌量（ng／μg）					
RCNK－1 細胞の馴化培地で2日間培養した細胞	0.55	0.43	0.69	0.56	0.10
RCNK－1 細胞の馴化培地で4日間培養した細胞	2.29	1.80	2.53	2.21	0.31
RCNK－1 細胞の馴化培地で7日間培養した細胞	6.06	5.15	6.68	5.97	0.63
低グルコース濃度にて刺激したときのインスリン分泌量（ng／μg）					
RCNK－1 細胞の馴化培地で2日間培養した細胞	0.35	0.32	0.43	0.37	0.05
RCNK－1 細胞の馴化培地で4日間培養した細胞	0.53	0.67	0.84	0.68	0.13
RCNK－1 細胞の馴化培地で7日間培養した細胞	1.02	1.80	1.10	1.31	0.35

【０１４０】

実施例８

本発明の手法により得られたインスリン分泌細胞の機能評価

２）トルブタミドによる刺激

実施例４により得られたインスリン分泌細胞を、低グルコース濃度のＫＲＢＢを培地と

して用いてインスリン分泌量を測定（図６（ａ）および表２参照）後、培地を低グルコース濃度のＫＲＢＢに１０μｍｏｌ／Ｌトルブタミド（シグマ社製）で１時間刺激した際の培地中のインスリン分泌量を測定（図６（ｂ）および表２参照）した。その結果、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞は従来技術と比較して高いインスリン分泌能を示した。

【０１４１】

【表２】

表　2

実験 No.	1	2	3	平均	標準偏差
トルブタミドで刺激後のインスリン分泌量（ng／μg）					
本発明					
DMEMで2日間培養した細胞	0.40	0.57	0.73	0.57	0.13
DMEMで4日間培養した細胞	0.97	1.29	2.27	1.51	0.55
DMEMで7日間培養した細胞	5.68	3.96	5.38	5.01	0.75
従来技術					
シュローダー法で分化誘導したインスリン分泌細胞				0.04	0.01
ダムール法で分化誘導したインスリン分泌細胞	0.26	0.35	0.61	0.41	0.14
トルブタミドで刺激前のインスリン分泌量（ng／μg）					
本発明					
DMEMで2日間培養した細胞	0.19	0.21	0.26	0.22	0.03
DMEMで4日間培養した細胞	0.29	0.33	0.49	0.37	0.09
DMEMで7日間培養した細胞	0.81	0.44	0.57	0.61	0.15
従来技術					
シュローダー法で分化誘導したインスリン分泌細胞				0.02	0.00
ダムール法で分化誘導したインスリン分泌細胞	0.06	0.09	0.12	0.09	0.02
	100pM	150pM	200pM		
本発明と従来技術との比較					
インスリン分泌量の比率（トルブタミドで刺激後）					
本発明（DMEMで2日間培養した細胞）／シュローダー法	15.32				
本発明（DMEMで4日間培養した細胞）／シュローダー法	40.82				
本発明（DMEMで7日間培養した細胞）／シュローダー法	135.44				
インスリン分泌量の比率（トルブタミドで刺激前）					
本発明（DMEMで2日間培養した細胞）／ダムール法	1.39				
本発明（DMEMで4日間培養した細胞）／ダムール法	3.72				
本発明（DMEMで7日間培養した細胞）／ダムール法	12.33				

【０１４２】

実施例９

本発明の手法により得られたインスリン分泌細胞の機能評価

３）糖尿病マウスへの移植実験

重症免疫不全（ＳＣＩＤ（severe combined immunodeficiency））マウス（体重２０ｇ、日本クレア株式会社）にストレプトゾトシン（２２０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内に投与し、一週後に血糖値が３６０ｍｇ／ｄＬ以上に２日続けてなった際に、糖尿病と判断した。当該糖尿病マウスを移植実験に使用した。本発明の分化誘導方法にて得られたインスリン分泌細胞（５×１０^{6}細胞）、未分化なマウスＥＳ細胞（５×１０^{6}細胞）、および正常マウス膵島４５０個を移植細胞として用いた。それぞれ５匹の糖尿病マウスに細胞移植を行った。なお、正常な健常マウス（３匹）および移植しない糖尿病マウスをコントロールとして使用した。マウスの左腎皮膜下に移植した後の血糖値の平均を図７および表３に示す。移植後の最初の５日間は中間型ヒトインスリンＮＰＨ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ社製）を２単位皮下注射し、その後の５日間は中間型ヒトインスリンＮＰＨ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ社製）を１単位皮下注射した場合の移植後の血糖値の平均を図７に示す。その後、３日おきに血糖値を測定し、移植後３週目以降は一週間に一回の割合で血糖値をＰｏｒｔａｂｌｅ　ｇｌｕｃｏｓｅ　ｍｅｔｅｒ　ＦｒｅｅＳｔｌｙｌｅ　ＴＭ（ＴｈｅｒａＳｅｎｃｅ社製）を使用して測定した。マウスＥＳ細胞を移植したマウスでは、ＮＰＨ投与を終えた後に血糖値が再度３６０ｍｇ／ｄＬ以上になり、治療効果がないことが明らかとなった。これとは対照的に、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞を移植したマウスは、健常マウス膵島を移植したマウスと同様にグルコース濃度が１００ｍｇ／ｄＬ程度を維持することができた。これは、当該インスリン分泌細胞の機能が健常マウス膵島と同程度であり、治療効果があることを示す。なお、治療を行わない糖尿病マウス全て（非治療群）およびＥＳ細胞を移植したマウス全ては１０週間以内に高血糖により死亡した。

【０１４３】

【表３】

表 3

移植後の日数（日）	0	3	6	9	12	15	18	21	28	35	42	49	56
本発明のインスリン分泌細胞(5百万個)を移植した糖尿病マウスの血糖値（mg／dL）													
動物 no.1	392	189	146	117	106	99	100	104	103	105	107	103	104
動物 no.2	379	168	167	131	126	111	103	95	106	95	104	110	108
動物 no.3	383	143	179	166	157	124	109	94	98	96	95	97	96
動物 no.4	389	154	156	155	140	110	107	103	102	106	109	115	102
動物 no.5	367	163	123	157	123	112	106	98	97	98	96	103	100
平均	382.0	163.4	154.2	145.2	130.4	111.2	105.0	98.8	101.2	100.0	102.2	105.6	102.0
標準偏差	8.76	15.37	19.09	18.25	17.14	7.93	3.16	4.07	3.31	4.60	5.71	6.25	4.00
マウス ES 細胞(5百万個)を移植した糖尿病マウスの血糖値（mg／dL）													
動物 no.1	387	211	256	266	374	393	395	389	398	401	412	421	
動物 no.2	369	164	213	247	372	378	388	404	409	414			
動物 no.3	371	172	241	253	358	386	377	388	389	395	389	392	389
動物 no.4	382	188	231	289	367	394	386	393	399	387	379	386	397
動物 no.5	388	181	254	303	383	396	405	400	404	411	418		
平均	379.4	183.2	239.0	271.6	370.8	389.4	390.2	394.8	399.8	401.6	399.5	399.7	393.0
標準偏差	7.96	16.09	15.86	21.31	8.23	6.62	9.37	6.24	6.68	9.99	16.04	15.28	4.00
正常マウス膵島(450膵島)を移植した糖尿病マウスの血糖値（mg／dL）													
動物 no.1	388	159	96	105	119	108	104	103	108	110	105	107	111
動物 no.2	394	141	98	94	123	103	114	115	108	103	98	103	106
動物 no.3	373	134	101	93	115	117	127	133	124	112	104	110	108
動物 no.4	369	139	117	98	110	119	124	123	125	114	98	98	100
動物 no.5	375	129	114	112	129	120	124	141	131	127	123	131	127
平均	379.8	140.4	105.2	100.4	119.2	113.4	118.6	123	119.2	113.2	105.6	109.8	110.4
標準偏差	9.54	10.19	8.61	7.17	6.52	6.71	8.52	13.33	9.45	7.83	9.18	11.34	9.05
健常マウス(非治療群)の血糖値（mg／dL）													
動物 no.1	83	88	80	87	89	94	88	85	87	90	82	89	87
動物 no.2	64	63	78	84	86	79	63	79	86	78	80	77	80
動物 no.3	73	84	88	79	78	86	73	74	80	83	96	91	94
平均	73.3	78.3	82.0	83.3	84.3	86.3	74.7	79.3	84.3	83.7	86.0	85.7	87.0
標準偏差	7.76	10.96	4.32	3.30	4.64	6.13	10.27	4.50	3.09	4.92	7.12	6.18	5.72

【０１４４】

実施例１０

本発明の手法により得られたインスリン分泌細胞の機能評価

４）バイオ人工膵臓を用いた糖尿病マウスの治療実験

バイオ人工膵臓を移植する糖尿病マウス（実施例９記載の方法で作製）を切開し、マウス皮下にバッグ型のバイオリアクター（図８参照。ＳＧ文献に作製方法が記載されている）を埋め込み３日間かけてバイオリアクター周囲への血管伸長を行った。バイオリアクターを埋め込んでから３日後および１０日後に本発明の分化誘導方法にて得られたインスリン分泌細胞（５×１０^{6}細胞）、未分化なマウスＥＳ細胞（５×１０^{6}細胞）、および正常マウス膵島４５０個をそれぞれ５匹の糖尿病マウスに埋め込んだバイオリアクターに細胞充填を行った。なお、正常な健常マウス（３匹）および移植しない糖尿病マウスをコントロールとして使用した。細胞を充填した後のマウス血糖値の平均を図９および表４に示す。充填後の最初の１０日間（細胞を充填してから、細胞のインスリン分泌能が回復するまでの間に相当する）は、中間型ヒトインスリンＮＰＨ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ社製）を２単位皮下注射した。ＮＰＨ注射終了後、３日おきに血糖値を測定し、移植後３週目以降は１週間に１回の割合で血糖値をＰｏｒｔａｂｌｅ　ｇｌｕｃｏｓｅ　ｍｅｔｅｒ　ＦｒｅｅＳｔｌｙｌｅ　ＴＭ（ＴｈｅｒａＳｅｎｃｅ社製）を使用して測定した。マウスＥＳ細胞を充填したバイオ人工膵臓を埋め込んだマウスでは、ＮＰＨ投与を終えた後に血糖値が再度３６０ｍｇ／ｄＬ以上になり、治療効果がないことが明らかとなった。これとは対照的に、本発明の分化誘導方法により得られたインスリン分泌細胞を埋め込んだバイオ人工膵臓を装着したマウスは、健常マウス膵島を充填したバイオ人工膵臓を装着したマウスと同様にグルコース濃度が１００ｍｇ／ｄＬ程度を維持することができた。これは、当該インスリン分泌細胞の機能が健常マウス膵島と同程度であり、治療効果があることを示す。なお、治療を行わない糖尿病マウス全て（非治療群）およびＥＳ細胞を充填したバイオ人工膵臓を埋め込んだマウス全ては１０週間以内に高血糖により死亡した。

【０１４５】

【表４】

表 4

細胞充填後の日数	0	3	6	9	12	15	18	21	28	35	42	49	56
本発明のインスリン分泌細胞(5百万個)を充填したバイオ人工膵臓を埋め込んだ糖尿病マウスの血糖値 (mg／dL)													
動物 no.1	391	211	216	208	166	189	158	149	151	128	135	118	115
動物 no.2	395	170	175	186	177	193	173	178	149	158	137	144	151
動物 no.3	363	158	189	174	143	143	153	157	127	108	103	105	98
動物 no.4	381	188	197	179	161	154	155	140	123	117	130	115	112
動物 no.5	375	181	206	202	156	163	179	173	151	137	121	124	111
平均	381.0	181.6	196.6	189.8	160.6	168.4	163.6	159.4	140.2	129.6	125.2	121.2	117.4
標準偏差	11.45	17.87	14.07	13.12	11.22	19.55	10.42	14.29	12.50	17.26	12.40	12.95	17.78
マウスES細胞(5百万個)を充填したバイオ人工膵臓を埋め込んだ糖尿病マウスの血糖値 (mg／dL)													
動物 no.1	377	221	217	214	208	371	389	394	391	397	395	392	391
動物 no.2	364	189	201	195	193	362	372	368	382	374	377	389	383
動物 no.3	377	231	216	211	219	390	388	388	398	404	408	412	416
動物 no.4	388	218	231	219	227	394	386	393	399	387	379	386	397
動物 no.5	368	211	204	203	213	396	405	400	404	411	418	423	431
平均	374.8	214.0	213.8	208.4	212.0	382.6	388.0	388.6	394.8	394.6	395.4	400.4	403.6
標準偏差	8.33	14.06	10.68	8.48	11.42	13.59	10.49	10.98	7.63	13.00	15.98	14.51	17.50
正常マウス膵島(450膵島)を充填したバイオ人工膵臓を埋め込んだ糖尿病マウスの血糖値 (mg／dL)													
動物 no.1	378	177	149	137	110	100	104	103	108	110	105	107	111
動物 no.2	393	157	170	151	123	111	114	115	113	106	118	114	121
動物 no.3	366	147	187	110	115	98	100	96	103	102	104	110	108
動物 no.4	373	147	146	119	100	97	95	97	93	87	88	93	94
動物 no.5	384	166	146	120	96	95	90	91	93	84	87	84	91
平均	378.8	158.8	159.6	127.4	108.8	100.2	100.6	100.4	102.0	97.8	100.4	101.6	105.0
標準偏差	9.24	11.53	16.38	14.68	9.83	5.64	8.19	8.24	8.00	10.40	11.64	11.29	11.12
健常マウス(非治療群)の血糖値 (mg／dL)													
動物 no.1	88	94	88	86	95	97	92	90	84	92	88	93	97
動物 no.2	64	63	78	84	86	79	63	79	86	78	80	77	80
動物 no.3	73	84	88	79	78	86	73	74	80	83	96	91	94
平均	75.0	80.3	84.7	83.0	86.3	87.3	76.0	81.0	83.3	84.3	88.0	87.0	90.3
標準偏差	9.90	12.92	4.71	2.94	6.94	7.41	12.03	6.68	2.49	5.79	6.53	7.12	7.41

【産業上の利用可能性】

【０１４６】

本発明の分化誘導方法により、健常ヒト膵臓細胞を代替するのに充分機能的であり、大

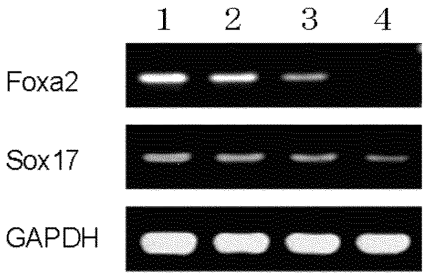
量供給が可能で安全なインスリン分泌細胞を誘導することができる。また、本発明の糖尿病治療剤、バイオ人工膵臓、研究試薬および創薬モデル動物は、糖尿病に対し安全性の高い治療が実現できる。

【配列表フリーテキスト】

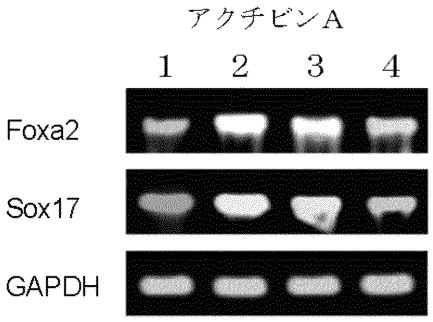
【０１４７】

配列番号１：Ｆｏｘａ２遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用５′プライマー
配列番号２：Ｆｏｘａ２遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用３′プライマー
配列番号３：Ｓｏｘ１７遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用５′プライマー
配列番号４：Ｓｏｘ１７遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用３′プライマー
配列番号５：Ｐｄｘ－１遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用５′プライマー
配列番号６：Ｐｄｘ－１遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用３′プライマー
配列番号７：Ｓｈｈ遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用５′プライマー
配列番号８：Ｓｈｈ遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用３′プライマー
配列番号９：ＧＡＰＤＨ遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用５′プライマー
配列番号１０：ＧＡＰＤＨ遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用３′プライマー

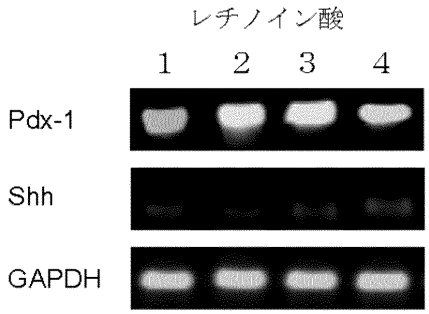
【図１】



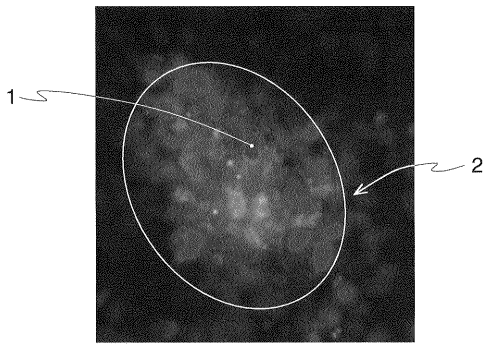
【図２】



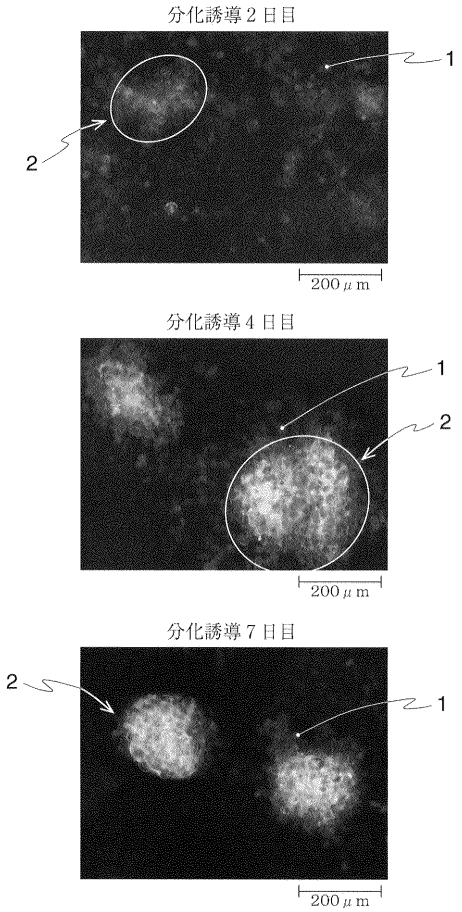
【図３】



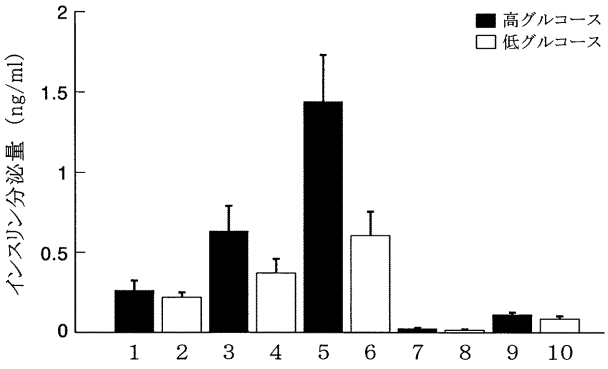
【図４（ａ）】



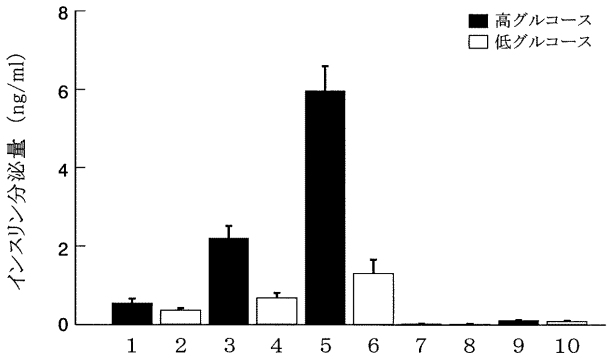
【図４（ｂ）】



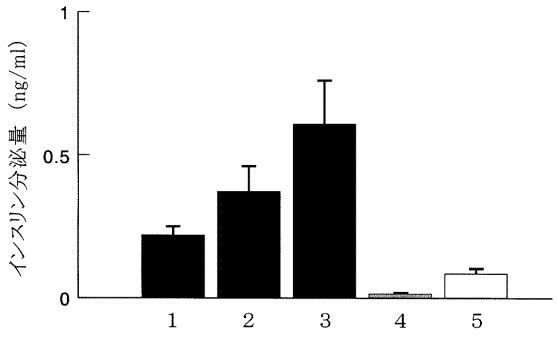
【図５（ａ）】



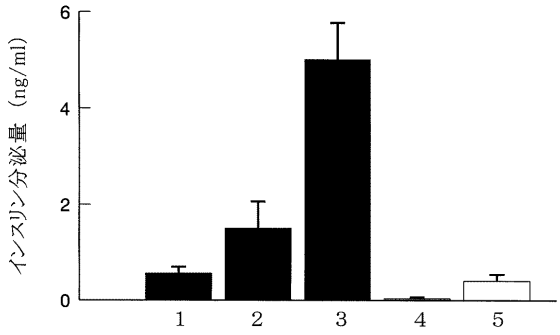
【図５（ｂ）】



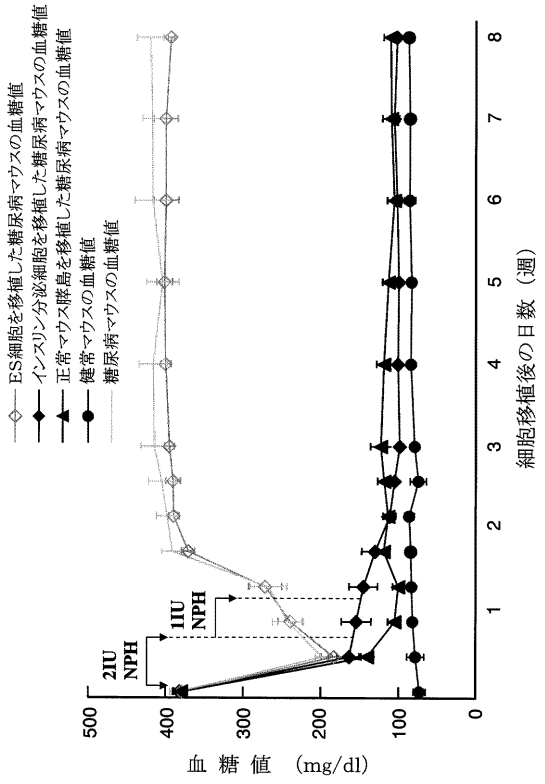
【図６（ａ）】



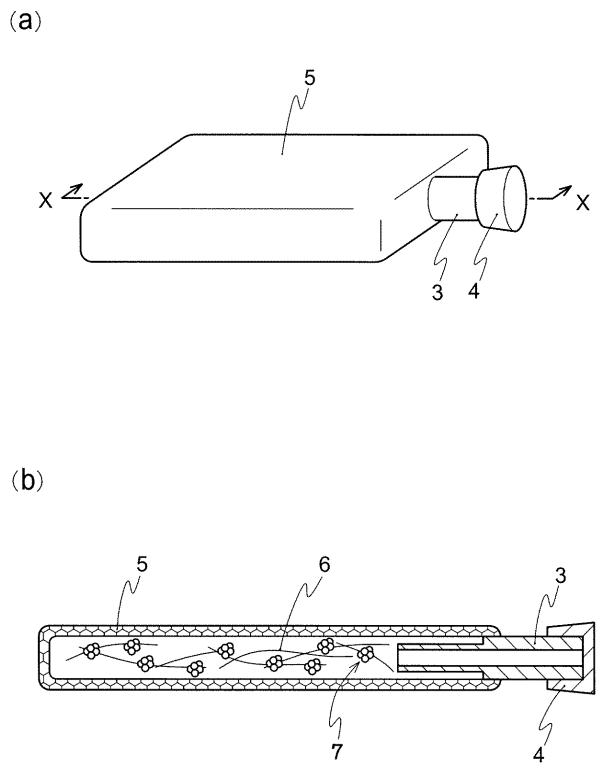
【図６（ｂ）】



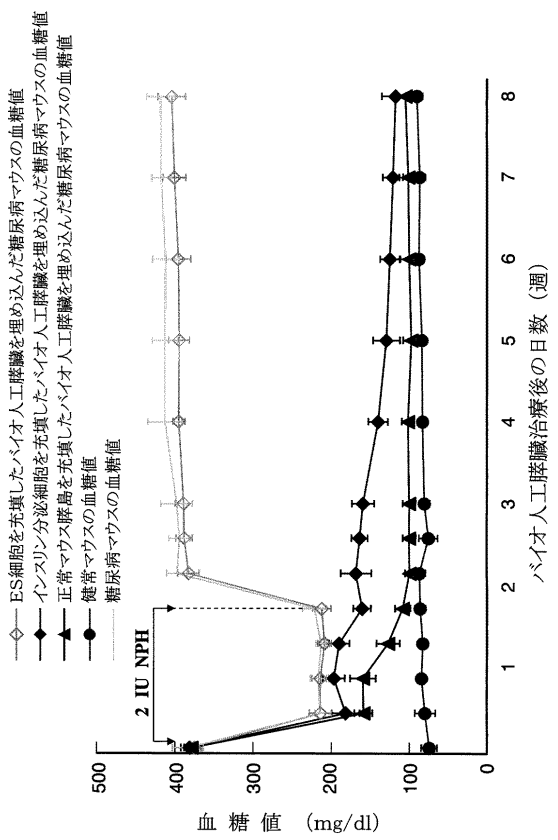
【図７】



【図８】



【図９】



【配列表】

2008066199000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/073352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/06(2006.01)i, *A01K67/027*(2006.01)i, *A61F2/02*(2006.01)i, *A61K35/12*(2006.01)i, *A61M1/36*(2006.01)i, *A61P3/10*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/06, A01K67/027, A61F2/02, A61K35/12, A61M1/36, A61P3/10, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D'AMOUR K.A. et al., Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, Nat. Biotechnol., 2006 Nov., Vol.24, No.11, pages 1392 to 1401 [Epub 2006.10.19]	1-29
X	NISHIMURA W. et al., A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β-cells, Dev. Biol., 2006.05.15, Vol.293, No.2, pages 526 to 539 [Epub 2006.04.03]	24-29
A	WO 2004/050827 A2 (TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LTD.), 17 June, 2004 (17.06.04), & EP 1567639 A2 & US 2006/0040385 A1	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 January, 2008 (23.01.08)	05 February, 2008 (05.02.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP2007／073352

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/06(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61F2/02(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61M1/36(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/06, A01K67/027, A61F2/02, A61K35/12, A61M1/36, A61P3/10, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	D' AMOUR K.A. et al., Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, Nat. Biotechnol., 2006 Nov., Vol.24, No.11, pages 1392 to 1401 [Epub 2006.10.19]	1-29

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
23.01.2008	05.02.2008

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4B	9455
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	森井 隆信 電話番号 03－3581－1101 内線 3448		

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（2007年4月）

国際調査報告 国際出願番号 PCT／JP2007／073352

C（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	NISHIMURA W. et al., A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β-cells, Dev. Biol., 2006.05.15, Vol.293, No.2, pages 526 to 539 [Epub 2006.04.03]	24-29
A	WO 2004/050827 A2 (TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LTD.) 2004.06.17 & EP 1567639 A2 & US 2006/0040385 A1	1-29

フロントページの続き

(72)発明者　リヴァス　カリーヨ　ホルヘ　デイヴィッド
岡山県岡山市北区鹿田町二丁目５番１号　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内
(72)発明者　田中　紀章
岡山県岡山市北区鹿田町二丁目５番１号　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

Ｆターム(参考) 4B024 AA11　CA04　CA11　HA14
4B065 AA91X BA25　BB15　BB19　CA44
4C081 AB35　CD34

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。